

**Gentransfer mittels unterschiedlicher viraler Gentransfervektoren in  
normale und maligne hämatopoetische Stammzellen**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Carsten Ludwig

aus Düsseldorf

Juli 2009

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden an der Inneren Klinik (Tumorforschung), Direktor Prof. Dr. S. Seeber, seit 01.10.2007 Direktor Prof. Dr. med. M. Schuler, der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter:

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>vi</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>viii</b>
<b>1     Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1    Therapeutischer Gentransfer .....	1
1.2    Retroviren .....	3
1.2.1    Biologie und Systematik der Retroviren.....	3
1.2.2    Gamma-Retroviren .....	4
1.2.3    Lentiviren .....	6
1.2.4    Foamyviren.....	7
1.3    Retrovirale Vektoren .....	9
1.3.1    Design replikationsdefekter retroviraler Vektoren.....	9
1.3.2    Pseudotypisierung .....	12
1.4    Die Hämatopoese .....	14
1.4.1    Organisation des hämatopoetischen Systems .....	14
1.4.2    Hämatopoetische Stammzellen .....	15
1.4.3    Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen.....	16
1.5    Leukämien und das Konzept leukämischer Stammzellen.....	18
1.5.1    Formen von Leukämien.....	18
1.5.2    Leukämische Stammzellen.....	20
1.6    Mesenchymale Stammzellen.....	21
1.7    Ziel der Arbeit.....	22
<b>2     Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1    Material .....	23
2.1.1    Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.2    Zellkulturmedien, Zusätze und Plastikmaterialien für die Zellkultur ...	24
2.1.3    Antikörper .....	24
2.1.4    Wachstumsfaktoren.....	25
2.1.5    Puffer und weitere Lösungen.....	25
2.1.6    Geräte .....	26
2.1.7    Bakterien, primäre Zellen, Zelllinien und Tiere .....	27
2.1.8    Retrovirale Vektoren.....	27
2.2    Kultivierung von E. coli .....	31
2.2.1    Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	31

2.2.2	Stammhaltung .....	31
2.2.3	Messung der optischen Dichte .....	31
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.3.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$ ..	32
2.3.2	Plasmidisolierung .....	32
2.3.3	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
2.3.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	33
<b>2.4</b>	<b>Zellkulturtechniken .....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	34
2.4.2	Neomycin-Selektion von 293T-Zellen.....	34
2.4.3	Mitomycin C-Behandlung .....	35
2.4.4	Gewinnung primärer Zellen .....	35
2.4.5	Herstellung von Kryokulturen .....	36
2.4.6	Transiente Erzeugung retrovirushaltiger Überstände .....	37
2.4.7	Produktion retroviraler Überstände mit Hilfe von stabilen Produzentenzellen.....	39
2.4.8	Titration retrovirushaltiger Überstände .....	39
2.4.9	Beschichtung von Kulturgefäßen mit RetroNektin® .....	40
2.4.10	Transduktion hämatopoetischer Zellen .....	41
2.4.10.1	<i>Transduktion hämatopoetischer Zelllinien</i> .....	41
2.4.10.2	<i>Transduktion primärer Zellen</i> .....	41
2.4.11	Durchflusszytometrie .....	43
2.4.12	Antikörperfärbung .....	44
2.4.13	CFU-Assay .....	44
<b>2.5</b>	<b>In-vivo-Untersuchungen im NOD/SCID-Mausmodell .....</b>	<b>45</b>
2.5.1	Transplantation transduzierter AML-Zellen.....	45
2.5.2	Analyse der mononukleären Zellen aus murinem Knochenmark, Milz und Blut transplanterter Tiere .....	45
2.5.3	Histologische Untersuchungen.....	46
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Produktion retroviraler Überstände.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	Transiente Erzeugung foamyviraler Überstände .....	48
3.1.2	Herstellung lentiviraler Überstände durch transiente Transfektion ....	51
3.1.3	Produktion gammaretroviraler Überstände von stabilen Produzentenzellen.....	54
<b>3.2</b>	<b>Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Gentransfer in primäre hämatopoetische Vorläuferzellen .....</b>	<b>58</b>
<b>3.4</b>	<b>Transduktion primärer maligner hämatopoetischer Stamm-zellen .....</b>	<b>65</b>
3.4.1	Transduktion von Blasten der akuten myeloischen Leukämie und des myelodysplastischen Syndroms .....	67
3.4.2	Transduktion von Blasten der akuten lymphatischen Leukämie.....	73

3.5	In-vivo-Untersuchungen von transduzierten primären AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell.....	76
3.6	Gentransfer in mesenchymale Stammzellen .....	83
4	Diskussion.....	86
4.1	Herstellung und Titration retroviraler Überstände.....	86
4.2	Vergleichender Gentransfer mit unterschiedlichen retroviralen Vektorsystemen .....	92
4.3	Untersuchungen im NOD/SCID-Mausmodell .....	104
4.4	Ausblick .....	108
5	Zusammenfassung .....	110
6	Literatur .....	112

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamin-Tetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
env	retrovirale Sequenz der Hüllproteine
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
Flt-3	Flt-3-Ligand
gag	Gen für retrovirales Kapsidprotein
GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HFV	Human foamy virus
i. v.	intravenös
IE	Infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
LB	Luria Bertani

L-Glu	L-Glutamin
LTR	lange terminale Sequenzwiederholung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	Multiplicity of Infection
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MSCV	Murine Stem Cell Virus
MW	Mittelwert
NOD/SCID	Nonobese diabetic / severe combined immunodeficiency
NTC-Platten	Non-Tissue-Culture-Platten; nicht beschichtete Zellkulturplatten
ORF	Offener Leserahmen
P/S	Penicillin + Streptomycin
PBS	phosphatgepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pol	Gen der retroviralen reversen Transkriptase (RNA- abhängige DNA-Polymerase)
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Natrium-Dodezylsulfat
s	Sekunde
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
TC-Platten	Tissue-Culture-Platten; beschichtete Zellkulturplatten
TPO	Trombopoetin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VSV-G	G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Retrovirale Genome. ....	3
Abbildung 1-2: Genereller Aufbau eines Retrovirus.....	5
Abbildung 1-3: Replikationszyklus der Gammaretroviren. ....	6
Abbildung 1-4: Replikationszyklus der Foamyviren. ....	9
Abbildung 1-5: Design retroviraler Vektoren.....	11
Abbildung 1-6: Transiente Virusproduktion.....	12
Abbildung 1-7: Retroviraler Gentransfer. ....	17
Abbildung 2-1: Foamyvirale Vektorsysteme. ....	28
Abbildung 2-2: Lentivirale Vektorsysteme.....	30
Abbildung 3-1: Vergleich von unterschiedlichen Transfektionsreagenzien bei der Herstellung foamyviraler Überstände. ....	49
Abbildung 3-2: Effizienz der Herstellung foamyviraler Partikel mit Hilfe des Zweiplasmid- und des Vierplasmidsystems.....	51
Abbildung 3-3: Ergebnis der Herstellung lentiviraler Überstände mit verschiedenen Transfektionsreagenzien. ....	52
Abbildung 3-4: Effizienz der Herstellung lentiviraler Partikel mit Hilfe des Zweiplasmid- und des Vierplasmidsystems.....	53
Abbildung 3-5: Beispielhaftes Ergebnis für eine durchflusszytometrische Analyse von Jurkat-Zellen nach Transduktion mit lentiviralen Überständen. ....	55
Abbildung 3-6: Anteil an EGFP-positiven RS-Zellen nach Transduktion mit verschiedenen viralen Vektorsystemen. ....	56
Abbildung 3-7: <i>EGFP</i> -Expression nach Transduktion von Jurkat- und RS-Zellen mit den verschiedenen retroviralen Vektorsystemen.....	57
Abbildung 3-8: Protokoll für den Gentansfer in primäre hämatopoetische Vorläuferzellen.....	60



Abbildung 3-9: Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse von transduzierten primären hämatopoetischen Vorläuferzellen. ....	61
Abbildung 3-10: Vergleich von Gentransferraten nach einer Transduktion von CD34 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen mit verschiedenen retroviralen Vektorsystemen. ....	62
Abbildung 3-11: Zusammenfassung der Gentransferraten in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Transduktion mit verschiedenen retroviralen Vektorsystemen. ....	63
Abbildung 3-12: <i>EGFP</i> -exprimierende Kolonien im CFU-Assay. ....	64
Abbildung 3-13: Beispielhaftes Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse transduzierter AML-Zellen. ....	68
Abbildung 3-14: Vergleichende Analyse von AML-Zellen nach Transduktion mit lentiviralen und gammaretroviralen Vektorsystemen. ....	69
Abbildung 3-15: Ergebnisse der Transduktionen primärer AML-Zellen mit lentiviralen und gammaretroviralen Überständen. ....	70
Abbildung 3-16: Beispiel für den Einfluß der MOI auf die Gentransferraten in transduzierten AML-Zellen. ....	71
Abbildung 3-17: Transduktionsergebnisse bei Einsatz verschiedener MOIs. ....	72
Abbildung 3-18: Protokoll für die Transplantation transduzierter AML-Zellen in NOD/SCID-Mäuse. ....	76
Abbildung 3-19: Durchflusszytometrische Analyse von murinem Knochenmark nach Transplantation humaner AML-Zellen. ....	77
Abbildung 3-20: Vergleichende Analyse des Engraftments von transduzierten AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell. ....	78
Abbildung 3-21: Durchflusszytometrische Analyse des Engraftments untransduzierter AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell. ....	81
Abbildung 3-22: Histologie eines murinen Femurs nach der intravenösen Applikation untransduzierter AML-Zellen in das Tier. ....	82
Abbildung 3-23: Durchflusszytometrische Analyse mesenchymaler Stammzellen. ...	85

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: ICTV-Nomenklatur der Retroviren .....	2
Tabelle 3-1: Isolierung von CD34 <sup>+</sup> -Vorläuferzellen aus Stammzellapheresaten.....	59
Tabelle 3-2: Informationen zu dem verwendeten Probenmaterial. ....	66
Tabelle 3-3: Informationen zu den verwendeten B-ALL-Proben. ....	74
Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gentransferversuche mit ALL-Zellen.....	75
Tabelle 3-5: Auswertung des ersten Transplantationsexperiments .....	79
Tabelle 3-6: Versuchsaufbau des zweiten Transplantationsversuchs .....	79
Tabelle 3-7: Engraftment der untransduzierten AML-Zellen in den Kontrollmäusen.	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Therapeutischer Gentransfer

Die Möglichkeiten, verschiedene Krankheitsbilder mit Hilfe gentherapeutischer Ansätze zu behandeln, haben sich in den letzten Jahren durch intensive Forschung weiter entwickelt und erfahren immer mehr Aufmerksamkeit, sowohl in der Wissenschaft, als auch in der Öffentlichkeit. Die zugrunde liegende Technik bei solchen Ansätzen ist der Gentransfer, also das Einbringen genetischer Information, zumeist in Form von DNA, in Zellen. Man kennt mittlerweile eine Reihe von Genen, die für eine Korrektur von krankhaften Phänotypen verwendet werden können, und es ist möglich synthetische DNA-Konstrukte, die therapeutische Gene enthalten, im ausreichenden Maßstab für klinische Anwendungen herzustellen. Der Erfolg der Gentherapie hängt dabei wesentlich von der Entwicklung geeigneter Vektoren, welche die DNA an den gewünschten Zielort transportieren, ab. Ein idealer Vektor sollte stabil, einfach herzustellen und hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen, wie zum Beispiel akuter Immunantworten, sicher sein. Außerdem sollte er einen effizienten Gentransfer in die jeweilige Zellpopulation oder den jeweiligen Gewebetyp ermöglichen. In der letzten Zeit wurde eine Reihe von Möglichkeiten für das Einbringen von Genen in eukariotische Zellen entwickelt. Diese lassen sich generell in virale und nonvirale Methoden unterteilen.

Bei den nonviralen Techniken unterscheidet man generell zwischen dem Einbringen von nackter DNA mit Hilfe von physikalischen Methoden, wie zum Beispiel der Elektroporation oder der so genannten „Gene Gun“, und dem Gentransfer unter Verwendung chemischer Transporter, zu denen kationische Lipide und kationische Polymere zählen [Van Tendeloo et al., 2001; Gao et al., 2007]. Dem gegenüber steht das Einbringen genetischer Information in Zellen mit Hilfe von viralen Vektoren. Es gibt inzwischen eine Vielzahl von viralen Vektorsystemen, die zu gentherapeutischen Zwecken eingesetzt werden können. Dabei ermöglichen einige Vektoren, wie zum Beispiel adenovirale, Vaccinia Virus (VV)- und Herpes Simplex Virus (HSV)-Vektoren nur einen transienten Gentransfer, da sie nicht in das Wirtsgenom integrieren. Dem gegenüber wird beispielsweise im Fall der retroviralen und Adeno-assoziierte Virus (AAV)–Vektoren die provirale DNA stabil in das Wirtsgenom eingebaut und somit an

die Tochterzellen weitergegeben [Van Tendeloo et al., 2001; Verma und Weitzman, 2005].

Retroviren stellen neben Adenoviren die am häufigsten verwendeten Gentransfersysteme dar. Die meisten retroviralen Vektorsysteme basieren auf Gamma-Retroviren, wie dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MMLV) oder dem „Spleen Focus-Forming Virus“ (SFFV). Sie benötigen jedoch zum Eintritt in den Nukleus die Degradation der Kernmembran während der Zellteilung, da sie diese nicht aktiv passieren können. Dagegen sind lentivirale und foamyvirale Systeme in der Lage, auch ruhende Zellen zu infizieren [Naldini et al., 1996b; Mergia et al., 2001]. Foamyviren konnten zudem mit keiner menschlichen Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden und besitzen einen breiten Wirts- und Gewebetropismus. Darüber hinaus verfügen sie über das größte Genom aller Retroviren, was theoretisch den Transfer von sehr großen heterologen DNA-Sequenzen erlaubt [Mergia und Heinkel, 2003]. Aus diesen Gründen sind diese retroviralen Vektorsysteme für den Gentransfer in hämatopoetische Zellen besonders interessant.

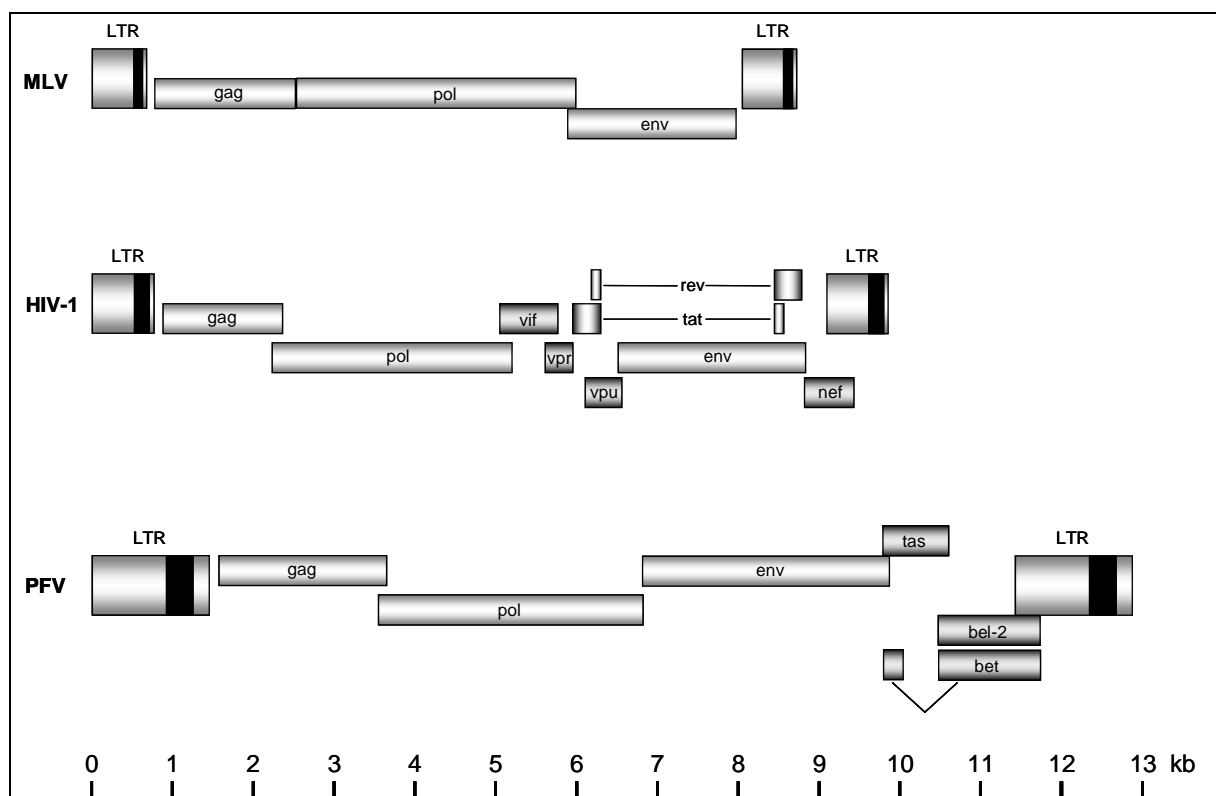
**Tabelle 1-1:** ICTV-Nomenklatur der Retroviren

Unterfamilie	Gattung	Wichtige Vertreter	Genom	Virusmorphologie
<i>Orthoretrovirinae</i>	Alpha-retroviren	Rous sarcoma virus (RSV) Avian leukosis virus (ALV)	einfach	zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	Beta-retroviren	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)	einfach & komplex	exzentrisch liegende, sphärische Kapside, „B-Partikel“ (MMTV) oder zylindrische Kapside, „D-Partikel“ (MPMV)
	Gamma-retroviren	Murine leukemia virus (MLV) Gibbon ape leukemia virus (GALV)	einfach	zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	Delta-retroviren	Human T-cell leukemia virus (HTLV) Bovine leukemia virus (BLV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	Epsilon-retroviren	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	Lentiviren	Human immunodeficiency virus (HIV)	komplex	zonusförmige Kapside
<i>Spumaretrovirinae</i>	Foamyviren	Prototype foamy virus (PFV) Feline foamy virus (FFV)	komplex	zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“

## 1.2 Retroviren

### 1.2.1 Biologie und Systematik der Retroviren

Bei Retroviren handelt es sich um RNA-Viren, deren Genom aus zwei 7-12 kb langen, als Doppelstrang vorliegenden, unsegmentierten +-Strang-RNA-Molekülen besteht. Sie besitzen ein Wirtsspektrum, das sich über viele Invertebraten- und Vertebratenspezies, eingeschlossen der meisten Säuger, erstreckt. Allerdings ist dieses bei den einzelnen viralen Spezies meist sehr begrenzt. Das Charakteristikum im Lebenszyklus der Retroviren besteht darin, dass diese Viren die normale Flussrichtung der genetischen Information von RNA nach DNA umkehren. Dies geschieht mit Hilfe einer viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, welche erstmals 1970 nachgewiesen und beschrieben wurde [Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970].



**Abbildung 1-1: Retrovirale Genome.**

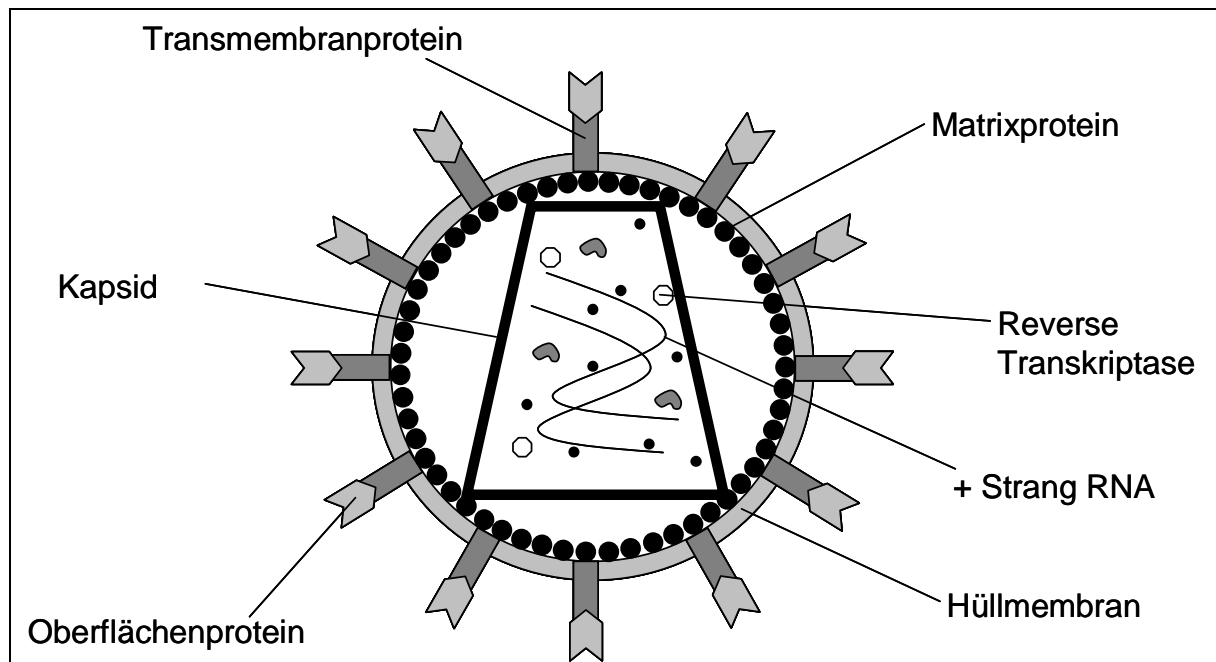
Dargestellt werden das einfache Genom des Murinen Leukämievirus und die beiden komplexen Genome des HI-Virus und eines Foamyvirus. Gezeigt sind die proviralen Genome. Abkürzungen: env: envelope; gag: group specific antigen; LTR: long terminal repeat; nef: negative factor; pol: polymerase; rev: regulator of expression of viral proteins; tas: transcriptional transactivator of spumavirus; tat: transactivator of transcription; vif: viral infectivity factor; vpr: viral protein r; vpu: viral protein u.

Die Familie der *Retroviridae* wird in zwei Unterfamilien unterteilt (siehe Tabelle 1-1). Die *Orthoretrovirinae* umfasst sechs Genera, während die *Spumaretrovirinae* nur die Gattung der Foamyviren beinhaltet. Diese Untergliederung erfolgt auf der Grundlage von gemeinsamen taxonomischen Charakteristika, wie zum Beispiel der Struktur, Zusammensetzung und Replikation der Viren, sowie Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Vertretern [Coffin, 1990; Coffin 1992a; Coffin1992b]. Aufgrund der Organisation ihres Genoms unterscheidet man bei Retroviren zudem zwischen einfachen und komplexen Retroviren [Vogt, 1997]. Während das Genom der einfachen Retroviren lediglich die Gene für die Strukturproteine (*gag*, *env*) und die viralen Enzyme (*pol*) umfasst, verfügen die komplexen Retroviren darüber hinaus über weitere Gene, deren Produkte regulatorische und akzessorische Aufgaben übernehmen (siehe Abbildung 1-1).

### 1.2.2 Gamma-Retroviren

Gamma-Retroviren sind sphärische Partikel mit einem ungefähren Durchmesser von 100 nm und bestehen aus einer Hülle sowie einem Kernkomplex (siehe Abbildung 1-2) [Vogt, 1996]. In ihre von der Wirtszelle abstammenden Hüllmembran sind die viralen Glykoproteine (*env*), das Oberflächen- und das Transmembranprotein, eingebettet. Diese Hüllmembran wird zudem von Innen mit Matrixproteinen (*gag*) ausgekleidet. Bei den einzelnen Vertretern der Retroviren exprimiert das *env*-Gen unterschiedliche Oberflächenproteine, die jeweils andere Rezeptoren erkennen, und somit ihren Tropismus definieren. So dient beispielsweise mCAT-1, ein Translokator für basische Aminosäuren, als Rezeptor für das ecotrope Env-Protein des „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MMLV), welches somit nur murine Zellen infizieren kann [Wang et al., 1991]. Dem gegenüber besitzt die amphotrope MLV-Variante, welche an den Natrium-abhängigen Phosphattransporter Pit-2 bindet, ein breiteres Wirtsspektrum [van Zeijl et al., 1994; Chien et al., 1997]. Der Kernkomplex enthält das Kapsid. In ihm befindet sich das virale RNA-Genom, das durch Nukleokapsidproteine (*gag*) stabilisiert wird und die für die Provirusgenese essentiellen viralen Replikationsenzyme (*pol*) Protease, Reverse Transkriptase mit RNaseH-Funktion und Integrase. In der proviralen DNA werden die Gene am 5'- und 3'-Ende durch zwei Sequenzwiederholungen, den „Long Terminal Repeats“ (LTRs), flankiert. Sie enthalten Promotoren und weitere für die virale Genexpression

notwendige *cis*-aktive Elemente, wie den Transkriptionsterminator und das Polyadenylierungssignal. C-terminal des 5'-LTRs befinden sich die Primer-Bindungsstelle, die der Initiation der reversen Transkription dient und das Verpackungssignal  $\psi$  ( $\Psi$ ), das für die Verpackung der genomischen RNA notwendig ist. N-terminal des 3'-LTRs befindet sich zudem der Polypurintrakt, welcher als Primer bei der DNA-Plusstrangsynthese eine Rolle spielt.

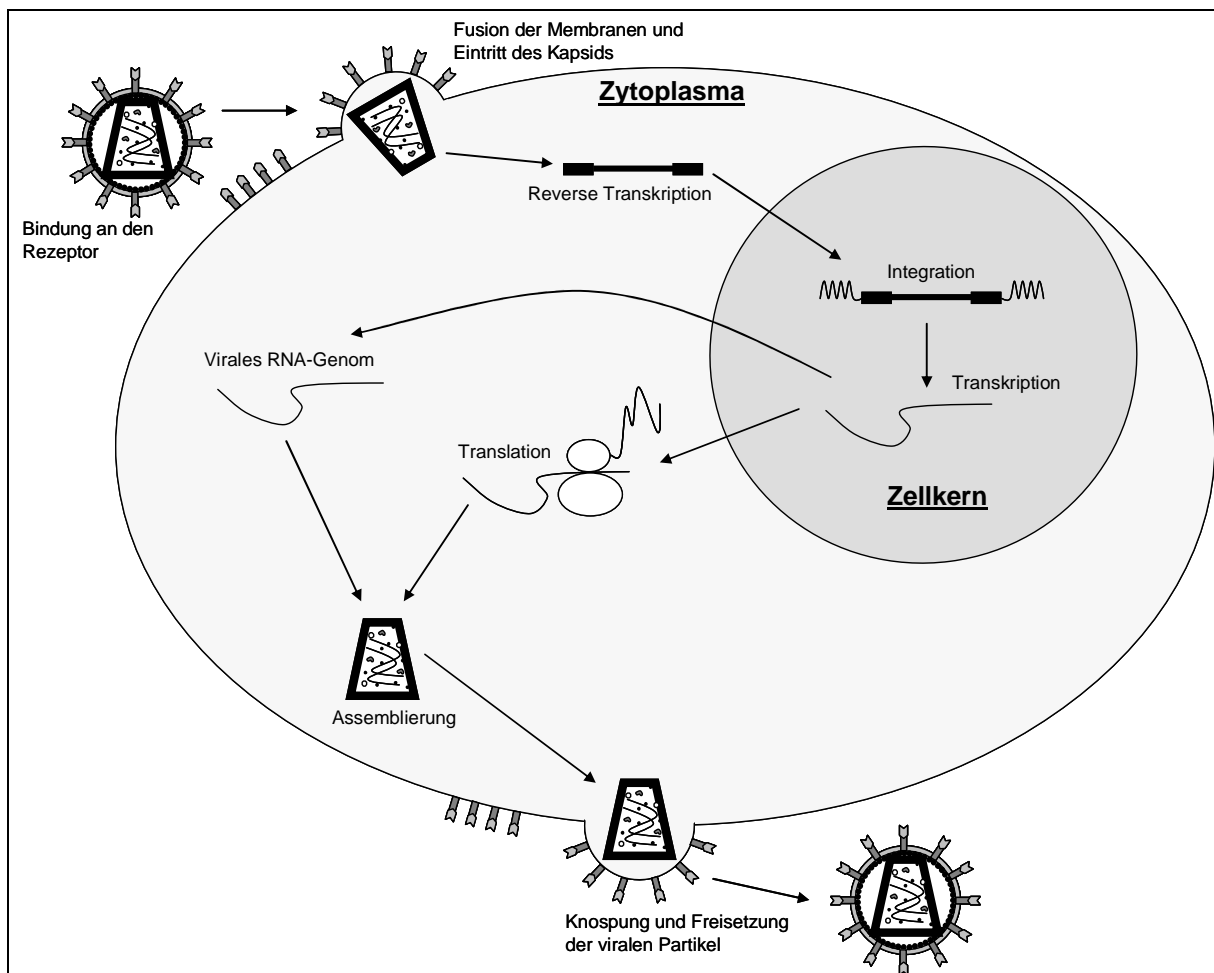


**Abbildung 1-2: Genereller Aufbau eines Retrovirus.**

Retroviren sind von einer Hüllmembran umgeben, in welcher die viralen Glykoproteine eingebettet sind. In ihrem Inneren befindet sich das Kapsid, das neben dem viralen Genom auch die essentiellen Replikationsenzyme, wie zum Beispiel die Reverse Transkriptase, enthält.

Prinzipiell besitzen alle Retroviren, im Fall der Foamyviren jedoch mit Einschränkung, den gleichen Replikationszyklus (siehe Abbildung 1-3). Durch spezifische Interaktionen zwischen dem viralen Hüllprotein und dem entsprechenden zellulären Oberflächenrezeptor kommt es zur Bindung des Viruspartikels an die Zielzelle. Dies führt zur Membranfusion von Virus und Zelle, sowie der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma. Hier erfolgt die reverse Transkription der viralen RNA in eine lineare doppelsträngige DNA, welche dann in den Nukleus transportiert und letztendlich als Provirus stabil in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird [Miller, 1990]. Lange Zeit ging man davon aus, dass diese Integration auf einer zufälligen Verteilung beruht. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass es bevorzugte Integrationsstellen, wie zum Beispiel transkriptionell aktive Genregionen, gibt [Nienhuis et al., 2006]. Die provirale DNA wird nun von der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie zur Synthese der einzelnen viralen Komponenten

verwendet. Die viralen Proteine und die ebenfalls vom Provirus transkribierte genomische virale RNA werden dann zu Viruspartikeln zusammengefügt (assembling) und verlassen durch Knospung an der äußeren Zellmembran die Wirtszelle (budding). Abschließend kommt es zur endgültigen Zusammenlagerung der Kernproteine, wodurch reife, infektiöse Virionen entstehen.



**Abbildung 1-3: Replikationszyklus der Gammaretroviren.**

Die Replikation beginnt mit der Fusion von Virushülle und Zellmembran, sowie der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma. Anschließend wird die virale RNA revers transkribiert und dann als Provirus in das Wirtsgenom eingebaut. Nun folgt die Transkription und Translation der proviralen DNA. Die synthetisierten viralen Komponenten werden im Zytoplasma zu Viruspartikeln zusammengesetzt und anschließend aus der Zellmembran abgeschnürt.

### 1.2.3 Lentiviren

Als Vertreter der komplexen Retroviren besitzen Lentiviren neben den Genen *gag*, *pol*, und *env* die beiden regulatorischen Gene *tat* und *rev*, welche für die virale Replikation essentiell sind, und die vier akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, und *nef*, die zwar bei der Virusproduktion *In-vitro* keine Rolle spielen, jedoch für die



Replikation und Pathogenese *In-vivo* von Bedeutung sind [Greene et al., 1991; Haseltine et al., 1991]. Bei der Expression dieser Gene können zwei Phasen unterschieden werden. Dabei führt die anfängliche Transkription des Provirus zur Bildung von mehrfach gespleißten mRNAs, die für die Proteine Tat (Transactivator of transcription), Ref (Regulator of expression of virion proteins) und Nef (Negative factor) kodieren. Die Translation dieser mRNAs erfolgt im Zytoplasma. Von dort gelangen die Proteine Tat, Ref und Nef anschließend wieder zurück in den Zellkern, wo sie die Bildung von ungespleißten Transkripten, die entweder als genomische RNA oder der Synthese der Gag- und Pol-Vorläuferproteine dienen, und einfach gespleißten mRNAs, welche für die Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *env* kodieren, verstärken. Nach dem Transport dieser mRNAs ins Zytoplasma kommt es zur Translation der Strukturproteine und akzessorischen Proteine.

Im Gegensatz zu Gamma-Retroviren können Lentiviren auch nicht-teilende Zellen infizieren, wobei sich in einigen Zelltypen der Zellzyklus zumindest in der G<sub>1b</sub>-Phase befinden muss, um eine effiziente reverse Transkription zu gewährleisten [Korin und Zack, 1998]. Der Präintegrationskomplex der Lentiviren kann aktiv durch die Kernporen der intakten Kernmembran transportiert werden. Zwar vermutet man, dass an dem Kernimport verschiedene Kernlokalisierungssignale, die unter anderem im Matrix-Protein und der Integrase gefunden wurden, beteiligt sind, jedoch sind die genauen Mechanismen bisher unverstanden [Gallay et al., 1995; Gallay et al., 1997; Bukrinsky et al., 1993; Fassati, 2006].

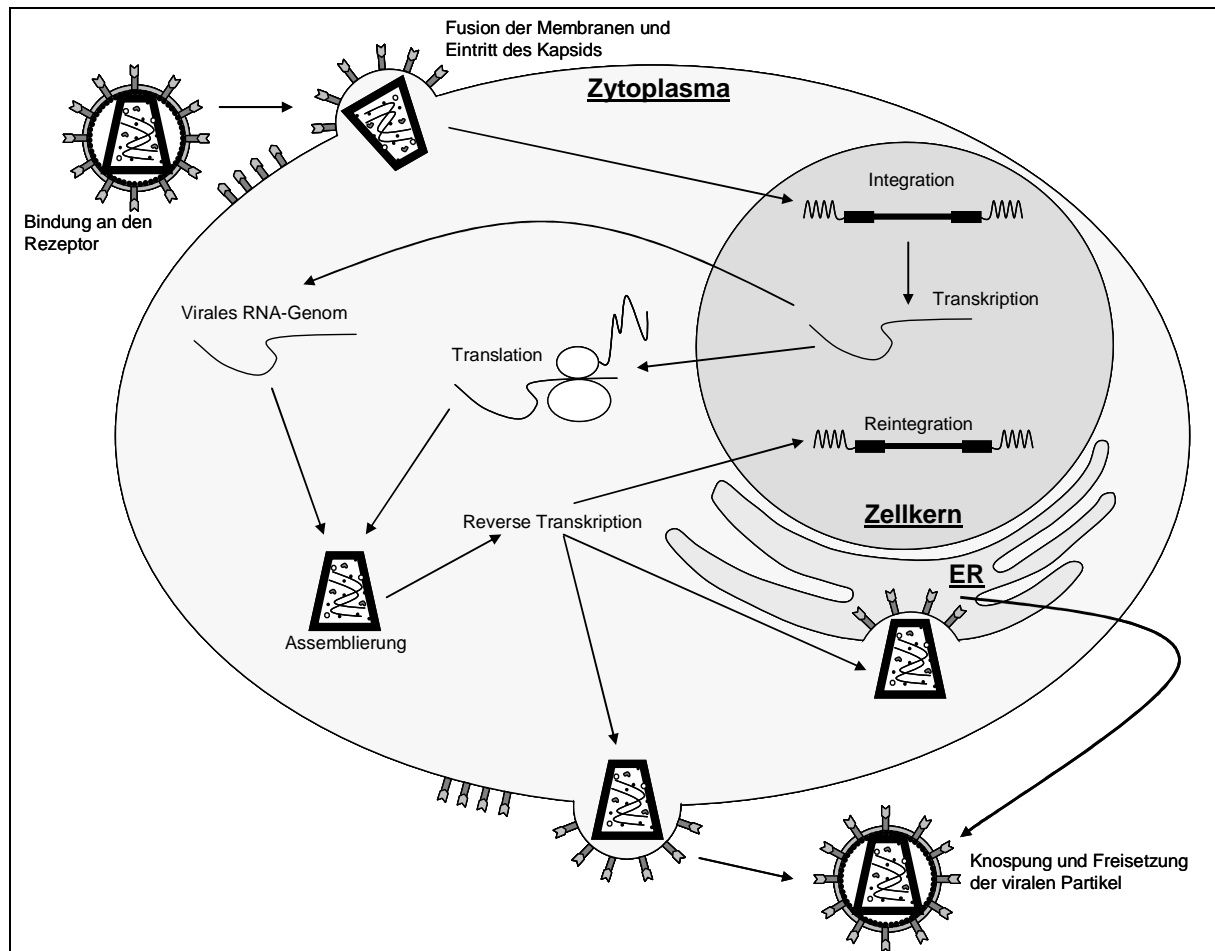
#### 1.2.4 Foamyviren

Wie die Lentiviren werden auch die Foamyviren, die sich einige Charakteristika mit den Hepadnaviren teilen, den komplexen Retroviren zugeordnet [Linial, 1999]. Ihr Genom verfügt neben den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* über die zusätzlichen offenen Leserahmen (ORFs) *tas* und *bet* am 3' Ende [Flügel et al., 1987]. Zudem besitzen Foamyviren neben dem Promotor in der U3-Region des 5'-LTRs einen zweiten internen Promotor (IP), der im 3'-Bereich des *env*-Gens lokalisiert ist und für die Expression der akzessorischen Gene genutzt wird [Löchelt et al., 1993]. Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator Tas („transactivator of spumaviruses“) reguliert. In Abwesenheit des Tas-Proteins besitzt der IP eine schwache Basalaktivität [Yang et al., 1997], während der LTR Promotor stumm ist

[Yu und Linial, 1993]. Dies ermöglicht zu Beginn der Virusreplikation die Bildung von Tas und Bet. Erreicht die Expression des Tas-Proteins schließlich ein gewisses Niveau, wird auch der 5'-LTR-Promotor aktiviert, so dass nun die Struktur- und Enzymproteine synthetisiert werden [Rethwilm, 2003].

Bei der Expression des *pol*-ORFs zeichnen sich Foamyviren durch eine weitere Besonderheit aus. Im Gegensatz zu allen anderen Retroviren, bei denen durch Suppression der Translationstermination oder einen ribosomalen Leserasterwechsel ein Gag-Pol-Fusionsprotein entsteht, generieren Foamyviren das Pol-Protein über ein gespleißtes Transkript [Enssle et al., 1997; Yu et al., 1996]. Damit erinnern sie an die Hepadnaviren, die ihre Polymerase auch unabhängig von den Strukturproteinen synthetisieren [Bonneville und Hohn, 1993; Loeb und Ganem, 1993]. Das Verpacken der Polymerase in die Viruspartikel geschieht bei Foamyviren demnach auf einem anderen Weg als bei den Orthoretroviren, wo Pol als Bestandteil des Gag-Pol-Fusionsproteins mit Hilfe von Gag-assoziierten Domänen verpackt wird. Stattdessen muss virale, genomische RNA vorhanden sein, mit der Pol interagieren kann [Heinkelein et al., 2002b; Peters et al., 2005].

Der Lebenszyklus der Foamyviren weicht in einigen Punkten von dem der Orthoretroviren ab, denn er besitzt Elemente, die für die Replikationsstrategien von Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren charakteristisch sind (siehe Abbildung 1-4) [Heinkelein et al., 2000]. So erfolgt beispielsweise bei Foamyviren die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms zu einem späteren Zeitpunkt im Replikationszyklus, anstatt, wie bei den anderen Retroviren üblich, direkt nach Infektion der Wirtszelle [Yu et al., 1999; Moebes et al., 1997]. Aus diesem Grund erhalten die infektiösen Viruspartikel bereits DNA. Zudem ermöglicht der Umstand, dass in der Zelle bereits ein funktionelles virales DNA-Genom existiert, einen intrazellulären Replikationszyklus, bei dem das Virus die Zelle nicht verlässt, sondern erneut in das Wirtsgenom integriert. Ein solcher Mechanismus ist auch bei den Hepadnaviren bekannt [Ganem und Schneider, 2001]. Ein weiteres Charakteristikum des foamyvirealen Lebenszyklus besteht darin, dass die Kapside aufgrund eines „ER-Retrieval-Signals“ im Env-Protein hauptsächlich in das endoplasmatische Retikulum knospen und dann anscheinend über intrazellulären Transport freigesetzt werden. Nur vergleichsweise wenige Viruspartikel verlassen direkt über die Zytoplasmamembran die Zelle [Lindemann und Goepfert, 2003].



**Abbildung 1-4: Replikationszyklus der Foamyviren.**

Bei Foamyviren besitzen bereits die infektiösen Viruspartikel ein DNA-Genom. Dieses wird als Provirus in das zelluläre Genom integriert. Dann erfolgt die Synthese der einzelnen viralen Genprodukte. Im Zytoplasma erfolgt die Assemblierung der viralen Partikel, die sowohl an der Plasmamembran, als auch an der intrazellulären Membran des ER knospen können. Daneben kommt es auch zu einem internen Replikationszyklus, bei dem das virale Genom wieder in den Zellkern gelangt und dort reintegriert.

## 1.3 Retrovirale Vektoren

### 1.3.1 Design replikationsdefekter retroviraler Vektoren

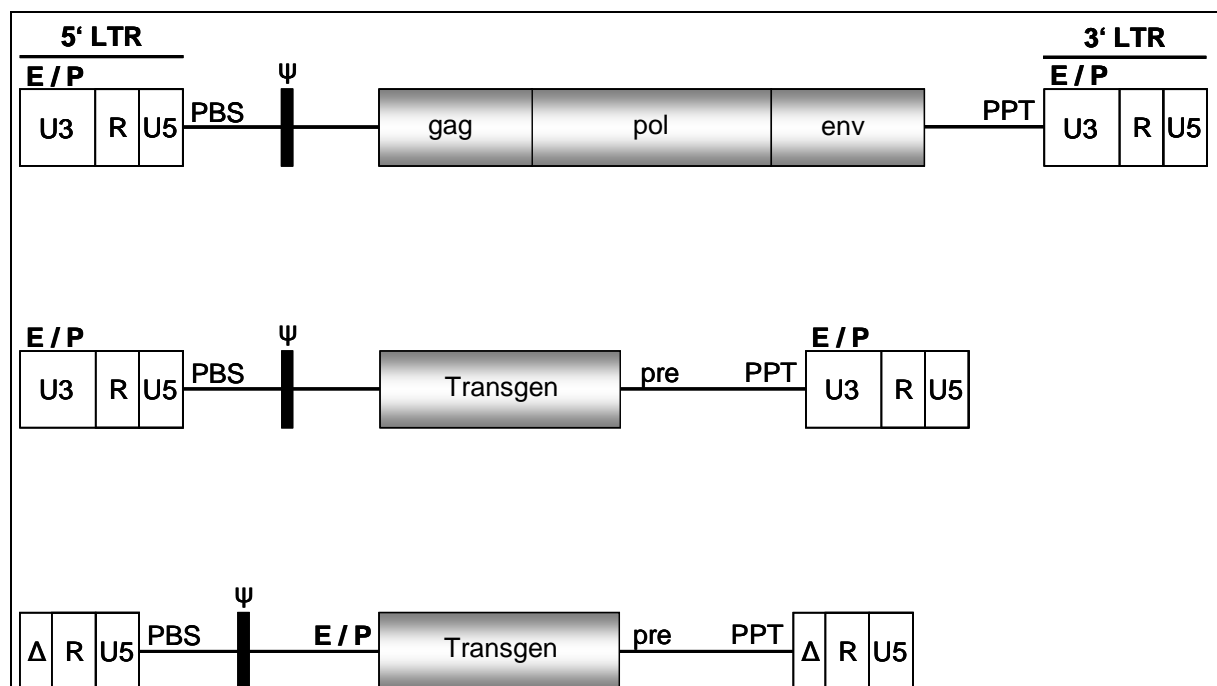
Bei der Entwicklung replikationsdefekter Transfervektoren werden die viralen trans-aktiven Gene aus dem Virusgenom entfernt und durch das gewünschte Transgen ersetzt. Nur die *cis*-aktiven Sequenzen, die für eine einzige Replikationsrunde notwendig sind, bleiben erhalten. Hierzu zählen die LTRs, die Primerbindungsstelle und der Polypurintrakt, welche für die reverse Transkription der genomischen RNA und die anschließende Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom notwendig sind, sowie die  $\Psi$ -Verpackungssequenz, die das Verpacken der viralen RNA in die

Viruspartikel ermöglicht. Um das Risiko der Entstehung replikationskompetenter retroviraler Vektorpartikel durch die homologe Rekombination der viralen Verpackungsgene zu minimieren, werden die *trans*-aktiven Gene auf mindestens zwei weitere Plasmidkonstrukte mit minimaler Sequenzhomologie verteilt. Zudem werden auch Sequenzübereinstimmungen zwischen den *cis*-Elementen des Transfervektors und der *in trans* agierenden Komponenten weitestgehend vermieden. Dabei zeigen die gammaretroviralen [Hildinger et al., 1999; D'Souza und Summers, 2005], lentiviralen [Cui et al., 2002; Logan et al., 2002; Follenzi et al., 2000] und foamyviralen [Peters et al., 2005; Trobridge et al., 2002a] Vektorsysteme große Unterschiede hinsichtlich der minimalen *cis*-Elemente, die für die Herstellung hochtitriger Überstände benötigt werden.

Hinsichtlich der Genexpression unterscheidet man zwischen zwei Vektor-Typen (siehe Abbildung 1-5). So gibt es Vektoren, bei denen die Expression des Transgens über das 5'-LTR des eingebauten Provirus erfolgt. In der Vergangenheit wurde dabei häufig die U3-Region des 5'-LTRs durch die Enhancer/Promotor-Region des humanen Cytomegalievirus (CMV) ersetzt, um die Effizienz der Genexpression und Virusproduktion zu steigern [Finer et al., 1994; Naviaux et al., 1996]. Dem gegenüber stehen die so genannten selbst-inaktivierenden (SIN)-Vektoren, bei denen die Enhancer/Promotor-Sequenzen in der U3-Region des 3'-LTRs deletiert wurden [Yu et al., 1986]. Nach reverser Transkription und Integration in das Wirtsgenom weist das provirale 5'-LTR, dessen Promotorelemente von dem 3'-LTR abstammen, daher keine transkriptionelle Aktivität mehr auf. Die Expression des Transgens erfolgt in diesem Fall durch einen internen Promotor. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von viralen und zellulären Promotor-Sequenzen, die hier zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel der CMV-Enhancer/Promotor, das GALV-LTR [Ramezani et al., 2000] oder der Promotor des humanen Elongationsfaktor 1 $\alpha$  [Schambach et al., 2006b]. SIN-Vektoren stellen in jedem Fall eine weitere Verbesserung im Bezug auf die Sicherheit dar, da vorklinische Arbeiten darauf hindeuten, dass bereits die LTR-Architektur als solche eine Rolle bei der, durch Insertionsmutagenesen ausgelösten Genotoxizität spielt [Montini et al., 2006; Modlich et al., 2006]. In der letzten Zeit wurde das Vektor-Design zudem durch weitere Modifikationen optimiert. Ein Beispiel dafür sind Insulatoren. Dabei handelt es sich um *cis*-aktive DNA-Elemente, die auf Chromosomen Transkriptionsbereiche voneinander trennen und somit deren gegenseitige Beeinflussung der Genregulation verhindern. Durch die Integration

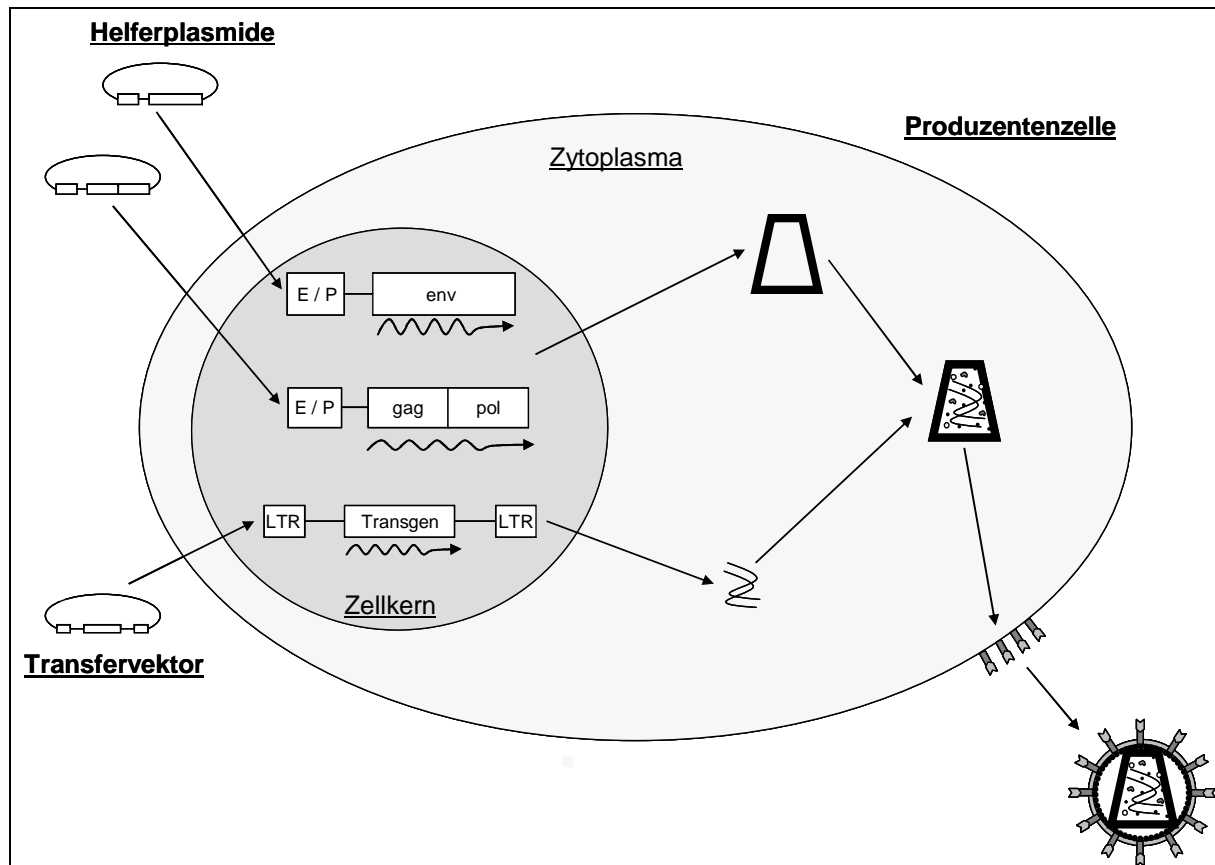
dieser Insulatorsequenzen in retrovirale Vektoren soll die Expressionskassette gegen störende Einflüsse des Wirtsgenoms, wie zum Beispiel das Transgen-„silencing“ durch Methylierung der LTRs, geschützt werden. Gleichzeitig möchte man aber auch das zelluläre Genom gegen Effekte, die durch Insertion des Transgens ausgelöst werden, abschirmen [Emery et al., 2000; Ellis, 2005]. Darüber hinaus steigert der Einbau des posttranskriptional regulatorischen Elements des „woodchuck hepatitis virus“ den Titer und die Expressionsraten der Vektoren, indem es die Prozessierung der 3'-RNA verbessert [Schambach et al., 2000; Schambach et al., 2006a].

Die Herstellung infektiöser Virenpartikel erfolgt häufig unter Verwendung von Verpackungszelllinien, die alle viralen Proteine, welche für die Replikation notwendig sind, exprimieren und dauerhaft Partikel in das Medium entlassen [Miller, 1990;



**Abbildung 1-5: Design retroviraler Vektoren.**

**Oben:** Die Abbildung zeigt schematisch die Organisation der proviralen DNA, in der die Gene am 5'- und 3'-Ende durch die beiden LTRs flankiert werden. Deren U3-Region enthält die Promotor/Enhancer-Elemente, welche neben weiteren cis-aktiven Elementen für die Genexpression notwendig sind. **Mitte:** Beim Design retroviraler Vektoren werden die viralen Gene aus dem Genom entfernt und durch das Transgen ersetzt. Lediglich die für eine einzige Replikationsrunde notwendigen cis-aktiven Sequenzen, wie zum Beispiel die Primerbindungsstelle, die Verpackungssequenz und der Polypurintrakt, bleiben erhalten. Bei dem dargestellten Vektor erfolgt die Expression des Transgens über das 5'-LTR des eingebauten Provirus. **Unten:** Dem gegenüber fehlen bei den SIN-Vektoren die Enhancer/Promotor-Sequenzen in der U3-Region der LTRs. Die Genexpression erfolgt hier durch einen internen Promotor. Retrovirale Vektoren besitzen zudem häufig weitere Modifikationen, wie zum Beispiel posttranskriptional regulatorische Elemente. **Abkürzungen:**  $\psi$ : Verpackungssignal; env: envelope; E / P: Enhancer/Promotor-Sequenz; gag: group specific antigen; LTR: long terminal repeat; PBS: Primer-Bindungsstelle; pre: posttranskriptional regulatorisches Element; pol: polymerase; PPT: Polypurintrakt.



**Abbildung 1-6: Transiente Virusproduktion.**

Bei der transienten Herstellung retroviraler Vektorpartikel erfolgt eine Kotransfektion des Transfektors, auf dem das Transgen liegt, mit Helferplasmiden, welche die Strukturgene tragen. Das Bereitstellen der Strukturgene *in trans* ermöglicht in den transfizierten Zellen die Synthese der einzelnen viralen Komponenten und somit die Genese der Vektorpartikel. Da die Helferplasmide jedoch nicht über das Verpackungssignal verfügen, werden die viralen Gene aber nicht in die Viruspartikel eingebaut. Dem gegenüber befinden sich auf dem Transfektor alle *cis*-regulatorischen Sequenzen, die für die Verpackung des Transgens in die Vektoren notwendig sind. Daher erhält man nach der Assemblierung der Virionen und dem anschließenden Knospen replikationsdefiziente Vektorpartikel, die das gewünschte Transgen tragen.

Horn et al., 2002; Ikeda et al., 2003]. Alternativ können rekombinante Viren auch auf transientem Weg durch die Kotransfektion des Transfektors mit Helferplasmiden, welche die viralen Genprodukte exprimieren, generiert werden (siehe Abbildung 1-6) [Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995].

### 1.3.2 Pseudotypisierung

Retroviren besitzen eine Glykolipid-Membranhülle, in der die Env-Proteine eingebettet sind, welche spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen erkennen und auf diese Weise Membranfusion und Zelleintritt vermitteln. Die Anwesenheit und Konzentration solcher Oberflächenrezeptoren auf den Zellen bestimmen die Infektiosität und somit das Transduktionspotential von retroviralen Vektoren. Um

dieses zu erhöhen oder den Virenpartikeln sogar ein völlig anderes Wirtsspektrum zu verleihen, können die Wildtyp-Hüllproteine gegen Hüllproteine anderer Viren ausgetauscht werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Pseudotypisierung“. In den meisten klinischen humanen Gentransferstudien wurden retrovirale Vektoren verwendet, die entweder mit dem Env-Protein des amphotropen MLV, welches an den Phosphatransporter Pit-2 bindet oder mit dem GALV-Hüllprotein, dem der Phosphatransporter Pit-1 als Rezeptor dient [O'Hara et al., 1990; Olah et al., 1994; Eiden et al., 1996], pseudotypisiert waren. Darüber hinaus wurden für die Pseudotypisierung retroviraler Vektoren inzwischen auch andere Hüllproteine, wie zum Beispiel das Env-Protein des feline Typ-C Virus RD114 [Cosset et al., 1995; Sandrin et al., 2002] oder das G-Protein des „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV-G) [Emi et al., 1991; Yee et al., 1994], verwendet. Letzteres vermittelt ein sehr breites Wirtsspektrum, da der Phospholipid-Rezeptor des VSV-G ubiquitär auf eukaryotischen Zellen verbreitet ist [Burns et al., 1993]. Das VSV-G-Protein kommt insbesondere bei der Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren zum Einsatz, da das Env-Protein des Wildtyp-HIV ausschließlich den Oberflächenmarker CD4, der nur auf Makrophagen und Lymphozyten vorkommt, als zellulären Rezeptor verwendet. Eine Reihe von Arbeiten hat mittlerweile gezeigt, dass sich mit VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren eine große Zahl verschiedener Zellen, wie zum Beispiel Neurone [Naldini et al., 1996b] und hämatopoetische Stammzellen [Guenechea et al., 2000; Scherr et al., 2002], effizient transduzieren lassen. Von Vorteil ist hierbei, dass VSV-G-pseudotypisierte Partikel relativ stabil sind und sich durch Ultrazentrifugation gut aufkonzentrieren lassen [Burns et al., 1993]. Jedoch erweisen sich die zytotoxischen Eigenschaften des VSV-G bei der Etablierung stabiler Verpackungszelllinien als problematisch [Yang et al., 1995; Ory et al., 1996].

Hinsichtlich der Pseudotypisierung stellen Foamyviren eine Ausnahme dar, denn im Gegensatz zu allen anderen Retroviren können sie ohne die Expression des Env-Proteins keine nicht-infektiösen „virus like particles“ bilden [Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998]. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, sie mit anderen viralen Hüllproteinen zu pseudotypisieren [Pietschmann et al., 1999].

## 1.4 Die Hämatopoese

Seit der Entwicklung der Technologien, die den retroviralen Gentransfer in eukariotische Zellen erlauben, war das hämatopoetische System stets ein bevorzugtes und interessantes Ziel für gentherapeutische Ansätze. Diese Gentransfer-Techniken liefern jedoch nicht nur mögliche Ansätze zur Behandlung einer Vielzahl von angeborenen und erworbenen Erkrankungen, sondern sie gewähren auch einen Einblick in die Biologie der Hämatopoese im Allgemeinen und der hämatopoetischen Stammzellen im Besonderen. Gerade dieses Verständnis für die biologischen Vorgänge im hämatopoetischen System trug in den letzten Jahren maßgeblich dazu bei, die Transduktionseffizienzen in hämatopoetische Zellen kontinuierlich zu verbessern.

### 1.4.1 Organisation des hämatopoetischen Systems

Im hämatopoetischen System gehen alle Blutzellen aus einer relativ kleinen Anzahl von sogenannten hämatopoetischen Stammzellen, die unter Einfluss lokaler Faktoren und unter humoralen Einflüssen eine Entwicklung in die verschiedenen Richtungen erfahren, hervor. Die Genese der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen erfolgt dabei hierarchisch. Ausgehend von der Stammzelle verläuft die Differenzierung über Vorläuferzellen und teilungsfähige „blastische“ Vorstufen, bis hin zu den vollständig ausdifferenzierten funktionellen Zellen des lymphohämatopoetischen Systems, wie Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen. Das Potential zur Differenzierung nimmt dabei von der Stammzelle zu den reifen Funktionszellen stetig ab. Die kennzeichnende Eigenschaft der pluripotenten Stammzellen, die sie von nachfolgenden Vorläuferzellen, welche ebenfalls pluripotent sind, unterscheidet, ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Sie können also Tochterzellen generieren, welche die gleichen Stammzell-Eigenschaften besitzen, wie die Elterngeneration. Genau wie Stamm- und Vorläuferzellen, sind auch die Blasten in der Regel in den blutbildenden Organen, also dem Knochenmark und den Lymphknoten, lokalisiert. Allerdings gibt es prinzipiell keine dichte Blut-Knochenmark-Schranke, und der Eintritt der Blasten in die Blutbahn wird in erster Linie von deren schlechter Verformbarkeit verhindert. Daher kann im Grunde jede Zellform im Blut vorkommen. Insbesondere



bei einer deregulierten Proliferation und Differenzierung, wie man sie beispielsweise bei Leukämien findet, kommen derartige Übertritte statistisch gehäuft vor.

### 1.4.2 Hämatopoetische Stammzellen

Die ersten Hinweise auf die Existenz hämatopoetischer Stammzellen lieferten 1961 Till und McCulloch [Till und McCulloch, 1961]. Sie entdeckten, dass eine Population von klonogenen Knochenmarkzellen myelo-erythroide Kolonien in der Milz von lethal bestrahlten Mäusen hervorbringen konnte. Gelegentlich enthielten auch diese Kolonien klonogene Zellen, die in sekundäre, ebenfalls lethal bestrahlte Empfängertiere retransplantiert werden konnten und dort deren Immunsystem rekonstituierten. Lange Zeit war die quantitative Analyse dieser primitiven hämatopoetischen Zellen nur mit funktionellen *In-vitro*-Studien, welche entweder auf Kolonie-Assays oder Langzeitkulturen basierten, möglich. Jedoch erlaubten die Kolonie-Assays nur den Nachweis von multipotenten und determinierten Vorläuferzellen, während mit Langzeitkulturen primitivere Zellen detektiert werden konnten. Diese waren funktionell allerdings sehr heterogen, und das Verwandtschaftsverhältnis dieser Zellen mit den *In-vivo* repopulierenden Stammzellen war unklar [Sutherland et al., 1990; Hao et al., 1995]. Daher wurde ein murines Xenotransplantationsmodell zum funktionellen Nachweis von primitiven hämatopoetischen Zellen entwickelt [Vormoor et al., 1994; Larochelle et al., 1996; van der Loo et al., 1998]. Das Modell basiert auf der Fähigkeit dieser Zellen, im Knochenmark von immundefizienten Mäusen, den "nonobese diabetic / severe combined immunodeficiency" (NOD/SCID) Mäusen, zu repopulieren und somit die humane Hämatopoese in diesen Tieren zu initiieren. Solche Zellen werden daher auch als „SCID-repopulierende Zellen“ (SRCs) bezeichnet. Das NOD/SCID-Modell wird häufig in präklinischen Studien, mit denen man neue Einblicke in die Biologie der Hämatopoese gewinnen möchte, eingesetzt. So konnten Dick und Mitarbeiter in diesem Modell zeigen, dass das Stammzell-Kompartiment sehr heterogen hinsichtlich des Selbsterneuerungs- und Repopulations-Potentials ist und man zwischen langzeit-repopulierenden und kurzzeit-repopulierenden Stammzellen unterscheiden kann [Guenechea et al., 2001].

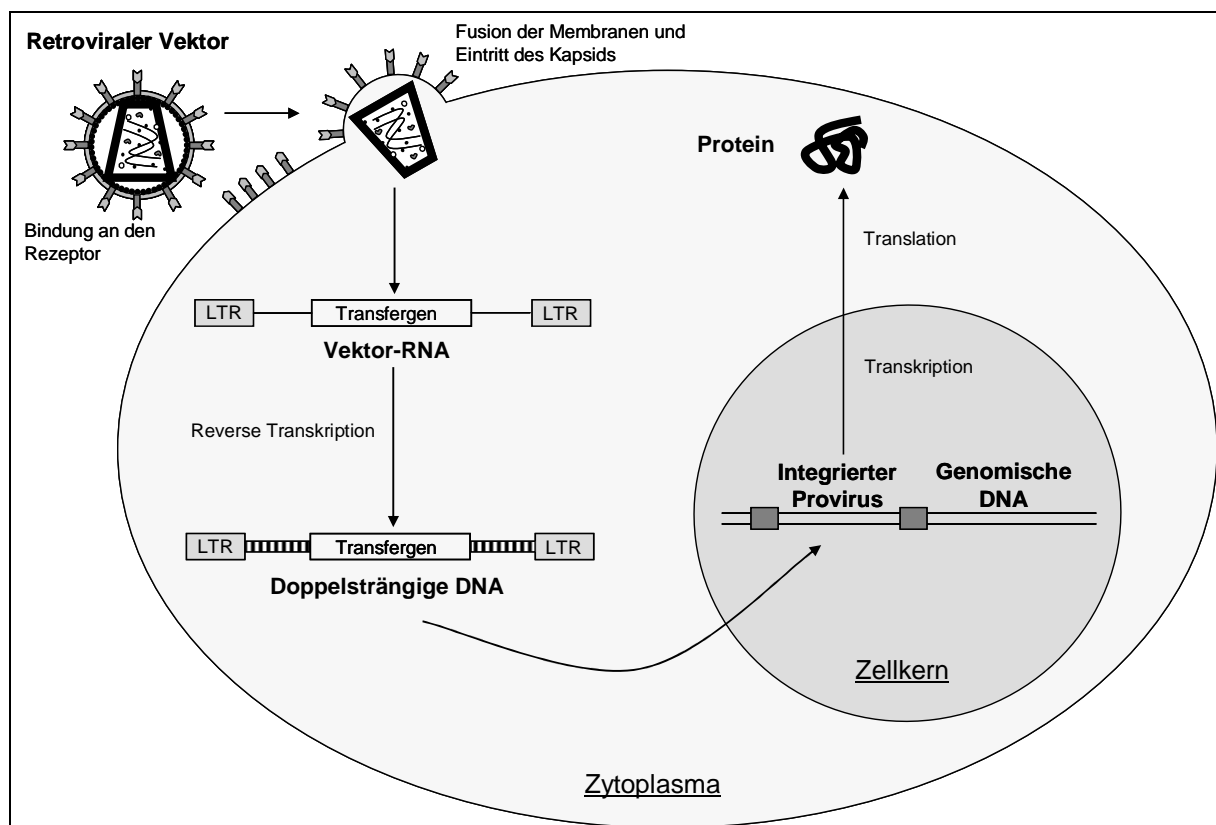
Mittlerweile spielt neben der funktionellen Charakterisierung von Stammzellen auch deren Phänotypisierung anhand von zellulären Oberflächenproteinen eine

zunehmend größere Rolle. Inzwischen kennt man eine ganze Reihe von Stammzellmarkern, die über monoklonale Antikörper definiert werden [Ziegler et al., 1996]. Von besonderer Bedeutung ist dabei der Oberflächenmarker CD34, bei dem es sich um ein transmembranes Glykoprotein handelt, und der nur auf einer kleinen Population von humanen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird [Krause et al., 1996]. Daher findet das CD34-Antigen heute in vielen klinischen Bereichen der Hämatologie Verwendung. So wird es beispielsweise zur Anreicherung von Stamm- und Vorläuferzellen oder zur Quantifizierung von Stammzellen im peripheren Blut eingesetzt.

### **1.4.3 Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen**

Die genetische Modifikation hämatopoetischer Stammzellen stellt heute eine der vielversprechensten Möglichkeiten zur Behandlung von erbten und erworbenen hämatopoetischen Erkrankungen dar [Williams et al., 2000]. Für diesen Zweck haben sich in den letzten Jahren retrovirale Vektoren als ideale Werkzeuge etabliert. Ihre Fähigkeit, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, erlaubt eine dauerhafte Modifikation der hämatopoetischen Stammzellen und der nachfolgenden Tochtergenerationen (siehe Abbildung 1-7). Auch andere Vektorsysteme, wie zum Beispiel AAV-Vektoren, wurden bereits für Gentransferversuche in hämatopoetische Zellen verwendet, jedoch nur mit begrenztem Erfolg [Hargrove et al., 1997; Srivastava, 2005]. Die am häufigsten verwendeten retroviralen Vektorsysteme basieren auf Gammaretroviren. Hier konnten durch Fortschritte im Design der Vektorkonstrukte [Hawley et al., 1994; Baum et al., 1996] und der Transduktionsprotokolle [Moritz et al., 1996; Murray et al., 1999] deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Gentransfer- und der Genexpressions-Effizienz in hämatopoetischen Zellen erreicht werden. Aufgrund dieser Weiterentwicklungen war es beispielsweise in vorklinischen Studien möglich, hämatopoetische Zellen durch Transduktion von Resistenzgenen effizient gegen chemotherapeutische Wirkstoffe zu schützen und *In-vivo* anzureichern [Jansen et al., 2002]. Darüber hinaus konnten Dick und Mitarbeiter einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des hämatopoetischen Systems leisten, indem sie durch gammaretrovirale Markierungsstudien zeigten, dass der Pool der hämatopoetischen Stammzellen von sehr heterogener Natur ist und es zwischen den Stammzellen große Unterschiede hinsichtlich des Proliferations-

und Selbsterneuerungs-Potentials gibt [Guenechea et al., 2001]. Die Möglichkeiten, die der retrovirale Gentransfer in hämatopoetische Zellen bietet, wurde erst kürzlich durch klinische Studien zur Behandlung der Granulomatose (X-linked chronic granulomatous disease) [Ott et al., 2006] und der verschiedenen Formen der SCID-Krankheit [Aiuti et al., 2002; Cavazzana-Calvo et al., 2000] eindrucksvoll dargelegt. Neben den bereits etablierten gammaretroviralen Vektoren spielen bei der genetischen Modifikation hämatopoetischer Zellen mittlerweile auch Lentiviren und Foamyviren aufgrund ihrer Fähigkeit, ruhende Zellen zu transduzieren, eine immer bedeutendere Rolle. Erste erfolgreiche Gentransferversuche mit neuen Generationen lentiviraler und foamyviraler Vektoren [Guenechea et al., 2000; Josephson et al., 2004] zeigen das Potential und die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dieser beiden Vektorsysteme in der Zukunft auf.



**Abbildung 1-7: Retroviraler Gentransfer.**

Wie beim Lebenszyklus der Wildtyp-Viren erfolgen zunächst die Interaktion der Vektorhülle mit den jeweiligen zellulären Oberflächenrezeptoren und anschließend die Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma. Hier kommt es dann zur reversen Transkription der Vektor-RNA und dem Einbau der erhaltenen DNA als Provirus in das Wirtsgenom. Da die Vektor-RNA jedoch nur das Transgen, und keine viralen Strukturgene enthält, kommt es bei der Expression der proviralen DNA nur zur Transkription und Translation des eingebrachten Gens. Es werden jedoch keine neuen Vektorpartikel gebildet und eine neue Replikationsrunde findet nicht statt. Zudem wird aufgrund der Replikationsstrategie der Retroviren das Transgen stabil in das Wirtsgenom der infizierten Zelle integriert und daher auch an die nachfolgenden Tochterzellen weitergegeben.

## 1.5 Leukämien und das Konzept leukämischer Stammzellen

### 1.5.1 Formen von Leukämien

Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die durch eine unkontrollierte Teilung von Leukozyten charakterisiert sind und auf einer Transformation von überwiegend hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen beruhen. Diese leukämischen Stamm- und Vorläuferzellen verlieren zumindest bei den akuten Leukämien aufgrund der Transformation weitestgehend die Fähigkeit zu funktionellen Zellen auszudifferenzieren, bleiben jedoch weiterhin proliferativ aktiv, was letztlich eine massive Verdrängung der restlichen funktionstüchtigen Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems zur Folge hat. Die Leukämiezellen breiten sich in der Regel zunächst im Knochenmark aus. Später treten sie dann vermehrt im peripheren Blut auf und infiltrieren eventuell Organe wie Leber, Milz und Lymphknoten, deren Funktion sie beeinträchtigen. Die Verdrängung der physiologischen Hämatopoese, hat Anämien (Erythrozytenmangel), Blutungsneigung (Thrombozytenmangel) und Infektionen (Leukozytenmangel) zur Folge.

Anhand des Krankheitsverlaufs kann zwischen akuten Leukämien, die plötzlich auftreten und ohne Behandlung rasch zum Tode führen, und chronischen Leukämien unterschieden werden. Diese entwickeln sich meist langsam und sind im Anfangsstadium häufig symptomarm. Später kommt es jedoch auch hier zu einem akuten Stadium. Zudem werden Leukämien nach der Herkunft der malignen Zellen unterschieden. Myeloische Leukämien gehen von den Vorläuferzellen der myeloischen Linie aus, während lymphatische Leukämien meist Vorläufer der B- oder T-Zellen betreffen. So unterscheidet man bei den chronischen Leukämien die Chronische Myeloische Leukämie (CML) und die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) und die akuten Formen werden dem entsprechend als Akute Myeloische Leukämie (AML) und Akute Lymphatische Leukämie (ALL) bezeichnet.

Die AML entsteht durch die unregulierte Proliferation unreifer Vorstufen der Myelopoese. Sie wird durch die French-American-British-Klassifizierung (FAB) anhand zytochemischer und zytomorphologischer Merkmale in acht Gruppen untergliedert. Dabei besitzen die leukämischen Zellen der Subtypen M0 bis M3 einen undifferenzierten oder promyelozytischen Differenzierungsgrad, während die Zellen der Gruppen M4 und M5 sich im Monozytenstadium befinden. Die FAB-Typen M6

und M7 zeigen schließlich eine morphologische Ähnlichkeit mit Erythrozyten und Megakaryoblasten [Parisi et al., 2002]. Für die AML findet die FAB-Klassifikation weiterhin klinische Anwendung. Jedoch wird sie zusehends durch die modernere WHO-Klassifikation ersetzt, die nicht nur zytomorphologische, sondern auch genetische und immunologische Gesichtspunkte mit einbezieht. Auch die ALL stellt eine heterogene Krankheit dar, die man vor allem nach immunologischen Kriterien einteilt. Hierdurch wird eine Zuordnung zu einem bestimmten Differenzierungsstadium und dem Ursprung aus B- oder T-Zellen möglich, d.h. zwischen der B-ALL, der T-ALL, der Common-ALL / prä-B-ALL, der Pro-B-ALL und der sehr seltenen Akuten Undifferenzierten Leukämie (AUL) kann unterschieden werden.

Leukämien sind häufig mit chromosomalen Aberrationen assoziiert, welche die Struktur und Funktion von Genen verändern und letztendlich deregulierte Proliferations- und Differenzierungsprozesse zur Folge haben. Dazu gehören zum einen durch Translokationen, Amplifikationen oder Punktmutationen modifizierte Gene, die als Onkogene bezeichnet werden und aktiv an der Entstehung von Leukämien beteiligt sind. Zum anderen kann aber auch der Verlust beider Allele eines Gens zu einer malignen Transformation führen. In diesem Fall spricht man von einem Tumorsuppressorgen. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist das Fusionsprotein BCR-ABL, das eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer CML spielt [Deininger et al., 2000]. Es entsteht durch eine Translokation, bei der die Tyrosinkinase Abl auf dem Chromosom 9 mit einem Fragment des BCR-Gens auf Chromosom 22 verschmilzt. Dieses Fusionsprotein besitzt eine verstärkte Tyrosinkinaseaktivität, durch die es zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege kommt. Darunter sind auch solche, die proliferative und antiapoptotische Funktionen erfüllen. Auf diese Weise verstärkt BCR-Abl vermutlich die Inhibition der Apoptose, während es gleichzeitig proliferative Stimuli liefert. Dies führt letztlich zu einer unkontrollierten Proliferation und Akkumulation von Leukozyten. Mittlerweile wurde aber mit Imatinib ein spezifischer Hemmstoff entwickelt, der erfolgreich die Aktivität der Tyrosinkinase ABL in den Zellen blockiert und auf diese Weise die massive Proliferation der Leukämiezellen supprimiert [Deininger et al., 2005].

### 1.5.2 Leukämische Stammzellen

Die Existenz so genannter „Krebs-Stammzellen“ wurde erstmals vor über 40 Jahren vorgeschlagen und diente als Erklärung für die funktionelle Heterogenität, die in Tumoren beobachtet worden war [Bruce et al., 1963]. Ein Nachweis und eine genauere Charakterisierung solcher Zellen gelangen jedoch erst mit der Entwicklung moderner Methoden, mit denen das Verhalten bestimmter Zellpopulationen untersucht werden konnte. Einen wichtigen Schritt stellen dabei die von John Dick und seinen Mitarbeitern durchgeführten Transplantationen von primären AML-Zellen in SCID-, oder NOD/SCID-Mäuse dar [Bonnet and Dick, 1997]. Diese Versuche zeigten, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen, die als „SCID Leukämie-initiierende Zellen“ (SL-ICs), bezeichnet wurden, dazu in der Lage waren, das Wachstum der Leukämie *In-vivo* zu initiieren und aufrecht zu erhalten. Zudem zeigten serielle Transplantationsexperimente, dass SL-ICS neben ihrer Fähigkeit zu differenzieren und proliferieren, auch eine hohe Selbsterneuerungs-Kapazität besitzen und somit als AML-Stammzellen angesehen werden können. Sie sind die einzigen Zellen, die dazu in der Lage sind, die Leukämie in Empfänger-Mäusen wieder anwachsen zu lassen [Lapidot et al., 1994; Bonnet und Dick, 1997]. Kürzlich konnte mit Hilfe lentiviraler Gen-Markierung, die dazu verwendet wurde, das Verhalten einzelner SL-ICs während serieller Transplantationen zu verfolgen, die Heterogenität dieser Zellen und ihre Fähigkeit, in sekundären und tertiären Empfängertieren zu repopulieren, gezeigt werden. Diese Beobachtungen deuten auf das Vorhandensein distinkter Klassen von Leukämie-Stammzellen mit unterschiedlichen Selbsterneuerungs-Kapazitäten, also ähnlich den Verhältnissen im normalen hämatopoetischen Stammzell-Kompartiment, hin [Hope et al., 2004]. Derzeit laufende Studien, die die Eigenschaften der Leukämie-Stammzellen genauer charakterisieren, könnten somit einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und zu einem besseren Verständnis der grundlegenden Vorgänge während der Entstehung von Leukämien leisten.

## 1.6 Mesenchymale Stammzellen

Neben den hämatopoetischen Stammzellen findet man im Knochenmark auch Stromazellen, die in letzter Zeit zunehmend in den Focus der Transplantationsmedizin und Gentherapie gelangen. Diese Zellen, die auch als Mesenchymale Stammzellen (MSCs) bezeichnet werden, sind in der Lage zu Zellen verschiedener mesenchymaler Gewebe, wie zum Beispiel Knochen, Knorpel oder Muskelgewebe, auszudifferenzieren [Pittenger et al., 1999]. Mesenchymale Zellen sind aus mehreren Gründen für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze interessant. Sie können auf einfache Art und Weise einem Patienten entnommen, und vor der Rückgabe *In-vitro* genetisch verändert und expandiert werden. Auf diese Weise können nicht nur immunologische Komplikationen vermieden werden, sondern auch Limitationen und Risiken durch eine direkte Applikation therapeutischer Vehikel, wie zum Beispiel retroviraler Vektoren, umgangen werden. Mittlerweile konnten klinische Studien zeigen, dass bei allogenen Transplantationen von hämatopoetischen Stammzellen eine Ko-Transplantation von MSCs zu einer Verbesserung des Engraftmants (darunter versteht man den Prozess, bei dem die transplantierten Stammzellen im Organismus repopulieren, was zur Rekonstitution der Hämatopoese führt) und zu einer Verhinderung der so genannten „Graft- versus-Host“-Krankheit führt [Maitra et al., 2004]. Darüber hinaus wurde bereits mehrfach über erfolgreiche Transduktionen von MSCs mit verschiedenen retroviralen Vektoren berichtet, die unter anderem auch *In-vivo* zur Synthese von Reportermolekülen, Interleukin 3 oder Humaner Faktor VIII führten [Allay et al., 1997; Bulabois et al., 1998; Chuah et al., 2000]. Trotz dieser viel versprechenden Versuche sind noch viele Aspekte in der Biologie dieser Zellen unverstanden und es bedarf weiterer Forschung, um das ganze Potential Mesenchymaler Stammzellen hinsichtlich klinischer Einsatzmöglichkeiten besser zu verstehen.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Retrovirale Vektoren stellen heute ein viel versprechendes Werkzeug zur genetischen Modifikation hämatopoetischer Stammzellen dar, und ermöglichen somit die Untersuchung von hämatologischen Krankheiten und die Entwicklung entsprechender therapeutischer Ansätze. Daher sollten im Rahmen dieser Dissertation mit der Durchführung folgender Arbeiten das Potential foamy- und lentiviraler Vektoren zur Transduktion von physiologischen und malignen, hämatopoetischen Stammzellen untersucht und mit dem von Gamma-Retroviren verglichen werden:

- Entwicklung und Optimierung von Transfektionsprotokollen für das lentivirale und foamyvirale Vektorsystem.
- Vergleichende Transduktionsversuche in hämatopoetischen Stammzellen mit foamy-, lenti- und gammaretroviralen Vektorsystemen.
- Vergleichende Transduktionsversuche mit den drei Vektorsystemen in leukämischen Zelllinien und primären Leukämiezellen.
- Untersuchung des Engraftments von untransduzierten und transduzierten primären AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell.
- Transduktion von mesenchymalen Stammzellen mit lentiviralen Überständen unter Verwendung eines einfachen Übernacht-Protokolls.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

6 x Loading Dye Solution	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ACCUTASE	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Aqua ad iniectabilia	Delta Select GmbH, Pfullingen
BD Pharm Lyse	BD Pharmingen, San Diego, USA
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calcium Phosphate Transfection Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Endofree Plasmid Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll-Paque Plus	Serva, Heidelberg
FKS (fötales Kälberserum)	Life Technologies, Eggenstein
Formalin 36,5%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FuGene 6	Roche, Basel, Schweiz
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gene Ruler 1000 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indirect CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
jetPEI	Qbiogene, Heidelberg
Lambda DNA / Hind III DNA Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mitomycin C	medac, Hamburg
Natium-Butyrat	Merck KGaA, Darmstadt

---

PBS	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyfect	Qiagen, Hilden
Retronektin <sup>®</sup>	TaKaRa, Otsu, Japan
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Qualität verwendet.

### 2.1.2 Zellkulturmedien, Zusätze und Plastikmaterialien für die Zellkultur

LB-Agar (Lennox-L-Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Broth-Base (Lennox-L-Broth-Base)	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM (High Glucose)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IMDM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle Plastikmaterialien wurden von BD Biosciences, New Jersey, USA, bezogen.

### 2.1.3 Antikörper

PE konjugierter hAK CD10	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PE konjugierter hAK CD13	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PE konjugierter hAK CD14	BD Pharmingen, San Diego, USA
PC5 konjugierter hAK CD19	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PE konjugierter hAK CD29	BD Pharmingen, San Diego, USA
PC5 konjugierter hAK CD33	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
FITC konjugierter hAK CD34	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PC5 konjugierter hAK CD34	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

PE konjugierter hAK CD34	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PE konjugierter hAK CD38	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
FITC konjugierter hAK CD44	BD Pharmingen, San Diego, USA
ECD konjugierter hAK CD45	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
PerCP konjugierter hAK CD45	BD PharMingen, San Diego, USA
PE konjugierter hAK CD71	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter hAK CD90	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC konjugierter hAK CD105	BD Pharmingen, San Diego, USA

#### 2.1.4 Wachstumsfaktoren

FGF-basic (rh)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Epo (rh)	Roche, Mannheim
Flt-3 (rh)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
G-CSF (rh)	Neupogen® 30, AMGEN, Thousand Oaks, CA, USA
Il3 (rh)	Sandoz, Basel, Schweiz
Il6 (rh)	Sandoz, Basel, Schweiz
SCF (rh)	CellGenix, Freiburg
TPO (rh)	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA

#### 2.1.5 Puffer und weitere Lösungen

CD34 <sup>+</sup> -Puffer	0,6% HSA 2 mM EDTA in PBS
FACS-Puffer	0,4% BSA in PBS
Gelatine-Lösung	0,1% Gelatine in PBS
IMDM/Methylzellulose	2,1% Methylzellulose in IMDM

50fach TAE-Puffer	242 g/l Tris 57,1 ml/l Eisessig 50 mM EDTA pH 8,5
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% Trypsin 0,53 mM EDTA in PBS

### 2.1.6 Geräte

CO2-Inkubator NU 2700 E	NUAIRE, Plymouth, USA
Durchflusszytometer EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld
Gefrierschrank -80°C, ULT 2186-7-Ultima 12	REVCO, Asheville, NC, USA
Gilson-Pipetten	Villers-le-Bel, Frankreich
Knick pH-Meter 761, Calimatic	Ingold Messtechnik, Steinbach
KX-21N Automated Hematology Analyzer	Sysmex, Illinois, USA
Lightwave S2000 UV/VIS Diode-Array Spectrophotometer	WPA, Cambridge, UK
LS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MidiMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MZ FL III Fluoreszenz-Stereomikroskop	Leica, Wetzlar
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester, NY, USA
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Nikon Eclipse E600-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	Olympus Optical Co., Hamburg
pipetus-akku, P 990 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt
pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt
Polaroid MP4 Land Camera	Polaroid GmbH, Dreieich- Sprendlingen
Polaroidfilm Typ 667 ISO3000/DIN36	Polaroid GmbH, Dreieich- Sprendlingen
Präzisionswaage AE120	Bosch, Jungingen
Sicherheitswerkbank NU4400-400E	NUAIRE, Plymouth, USA

---

Sicherheitswerkbank NU4400-600E	NUAIRE, Plymouth, USA
Vortexer L46	GLW, Würzburg
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge GS-6R	Beckman Instruments, München
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München
Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München

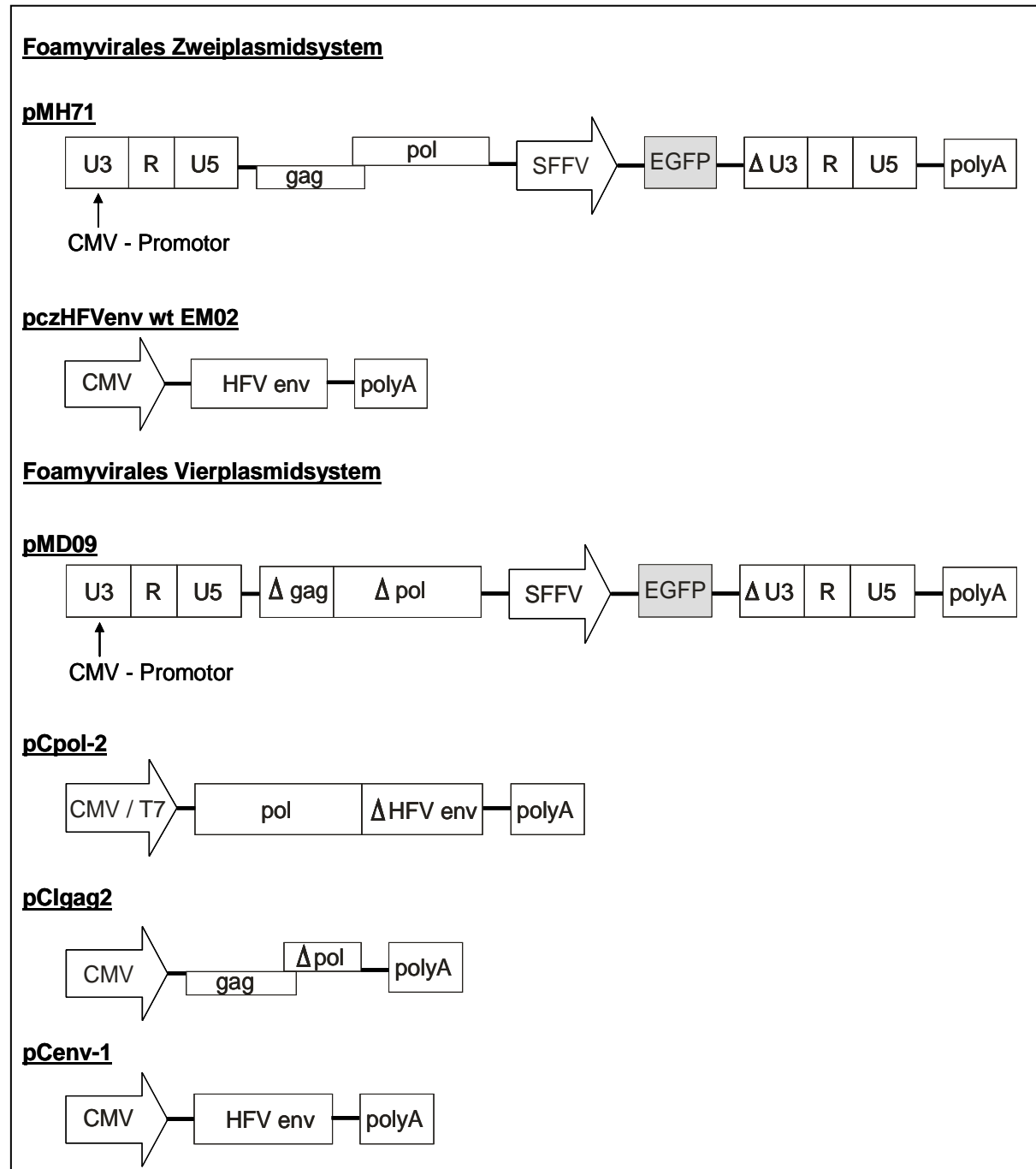
### 2.1.7 Bakterien, primäre Zellen, Zelllinien und Tiere

293T	ATCC, Manassas, VA, USA
CD34 <sup>+</sup> -Apharesate	Stammzelllabor der Inneren Klinik / Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen
CD40L-L	PD Dr. D. Dillo, Düsseldorf
HT1080	ATCC, Manassas, VA, USA
Jurkat	PD Dr. D. Dillo, Düsseldorf
Max Efficiency DH5 $\alpha$ Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe
Mesenchymale Stammzellen	PD Dr. D. Dillo, Düsseldorf
NOD/LtSz-Prkdcscid/Prkdcscid (NOD/SCID)-Mäuse	Charles River Laboratories, Wilmington, USA
Patientenmaterial	Innere Klinik / Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen
PGS11EG	PD Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf
RS	PD Dr. D. Dillo, Düsseldorf

### 2.1.8 Retrovirale Vektoren

Für die transiente Herstellung der foamy- und lentivirushaltigen Überstände wurden sowohl Zweiplasmid-, als auch Vierplasmidsysteme verwendet. Beim Zweiplasmidsystem wurden in beiden Fällen selbst-inaktivierende Expressionsvektoren verwendet, bei denen das *EGFP*-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden U3 Promotors des „Spleen focus-forming

virus“ (SFFV) steht. Im 3'-Bereich sind bei dem foamyviralen Konstrukt pMH71 (Dr. M. Heinkelein, Würzburg) die Gene *bel*, *bet* und *tas* und bei dem lentiviralen Plasmid pGJ3egfp [Jarmy et al., 2001] alle akzessorischen Gene bis auf *rev* deletiert worden.



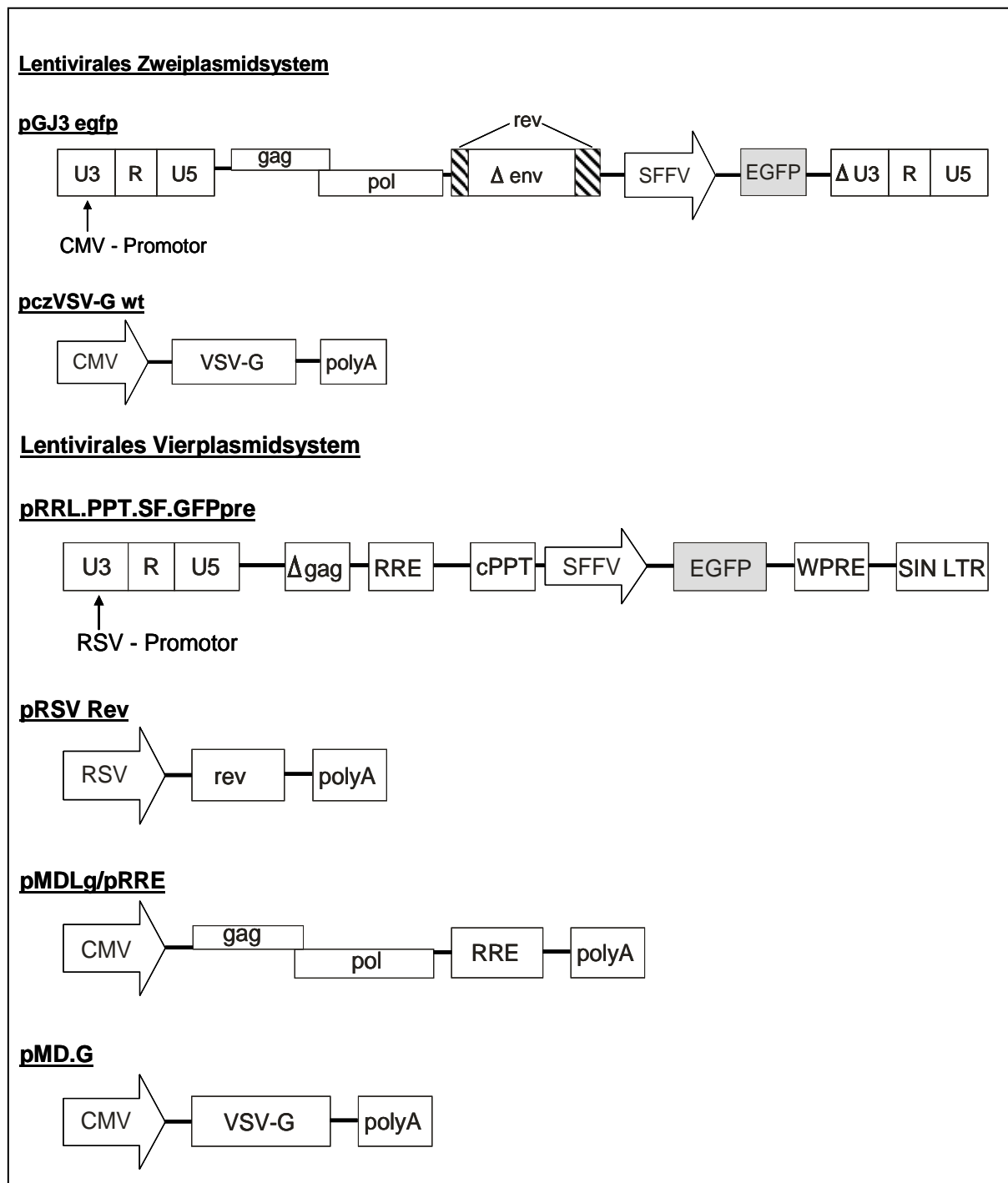
**Abbildung 2-1: Foamyvirale Vektorsysteme.**

Bei den Foamyviren kam ein Zweiplasmidsystem, bei dem sich die Strukturgene und das Markergen auf einem Vektor befanden (pMH71), zum Einsatz. Außerdem wurde auch ein Vierplasmidsystem getestet, bei dem *gag* (pClgag2), *pol* (pCpol-2) und das Markergen (pMD9) auf verschiedenen Plasmiden lagen. Für die Herstellung der foamyviralen Partikel wurde in beiden Fällen das Wildtyp HFV-Hüllprotein (pCenv-1 beziehungsweise pczHFVenv wt EM02) benutzt. Abkürzungen: CMV: Cytomegalievirus-Enhancer/Promotor; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; env: retrovirale Sequenz der Hüllproteine; gag: Gen für virales Kapsidprotein; pol: Gen der retroviralen reversen Transkriptase; poly-A: Polyadenylierungs-Sequenz; SFFV: U3 Promotor des „Spleen focus-forming virus“.

Die Expression der viralen Strukturproteine Gag und Pol werden auf beiden Plasmiden durch den starken Cytomegalievirus (CMV)-Enhancer/Promotor reguliert. Zusätzlich zum Expressionskonstrukt pMH71 wurde das Plasmid pczHFVenvEM02 [Lindemann und Rethwilm, 1998], welches das Wildtyp HFV-Hüllprotein trug, zur Produktion foamyviraler Überstände verwendet. Die lentiviralen Partikel wurden unter Verwendung des Vektors pczVSV-G [Pietschmann et al., 1999] mit dem Glykoprotein des „Vesicular stomatitis virus“ (VSV) pseudotypisiert. Auf beiden Plasmiden stehen die Gene der Hüllproteine unter Kontrolle des CMV-Promotors.

Beim foamyviralen Vierplasmidsystem (siehe Abbildung 2-1) liegen die Strukturgene *gag* und *pol* separat auf den zwei Plasmiden pClgag2 [Heinkelein et al., 2002a] und pCpol-2 [Heinkelein et al., 1998] vor. Das HFV-Hüllprotein befindet sich auf dem Vektor pCenv-1 [Fischer et al., 1998]. Die Expression der Struktur- und Hüllproteine wird auch hier durch den CMV-Promotor angetrieben. Das Expressionskonstrukt pMD9 [Heinkelein et al., 2002a] enthält das *EGFP*-Gen, welches unter der Kontrolle des SFFV-Promotors in der U3-Region steht. Zudem besitzt es einen CMV-Promotor und zwei stromabwärts gelegene cis-aktive Sequenzen, die für die Virus Replikation notwendig sind.

Zu dem lentiviralen Vierplasmidsystem (siehe Abbildung 2-2) gehören das Konstrukt pMDLg/pRRE [Dull et al., 1998] das die Strukturgene *gag* und *pol*, sowie das *rev response element* (RRE) enthält, und das Plasmid pMD.G [Naldini et al., 1996a], auf dem die Sequenz für das VSV-G Hüllprotein liegt. Auch hier wird die Expression der Struktur- und Hüllproteine durch einen CMV-Promotor reguliert. Auf dem Vektor pRSV Rev [Dull et al., 1998] befindet sich das *rev* Gen, welches als RNA-Exportfaktor fungiert und unter der Kontrolle des „*Rous sarcoma virus*“ (RSV)-Promotors steht. Der Expressionsvektor pRRL.PPT.SF.GFPpre [Dull et al., 1998] enthält neben dem *EGFP*-Markergen, das durch einen SFFV-Promotor reguliert wird, auch das *Rev-responsive Element*. Stromaufwärts des Transgens liegt ein zentraler Polypurintrakt und stromabwärts ist das *post-transcriptional regulatory element* des „*Woodchuck hepatitis virus*“ lokalisiert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Herr Dr. A. Schambach, Hannover, und Herr PD Dr. H. Hanenberg, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 2-2: Lentivirale Vektorsysteme.**

Bei dem Lentiviralen Zweiplasmidsystem liegen sowohl die regulatorischen Gene und Strukturgene, die für die Partikelbildung notwendig sind, als auch das Markergen *EGFP* auf einem Vektor (pGJ3egfp). Dem gegenüber befinden sich beim Vierplasmidsystem *rev* (pRSV Rev), *gag* und *pol* (pMDLg/pRRE), sowie das Markergen (pRRL.PPT.SF.GFPpre) getrennt auf verschiedenen Vektoren. Bei beiden Systemen wurden die Virenpartikel mit dem VSV-G Hüllprotein (pMD.G beziehungsweise pczVSV-G wt) pseudotypisiert. Alle Gene standen unter der Kontrolle heterologer Promotoren, die eine effizientere Generierung viraler Partikel ermöglichte. Abkürzungen: CMV: Cytomegalievirus-Enhancer/Promotor; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; env: retrovirale Sequenz der Hüllproteine; gag: Gen für virales Kapsidprotein; pol: Gen der retroviralen reversen Transkriptase; poly-A: Polyadenylierungs-Sequenz; RRE: „rev response element“; RSV: „Rous sarcoma virus“-Promotor; SFFV: U3 Promotor des „Spleen focus-forming virus“; VSV-G: Glykoprotein des „Vesicular stomatitis virus“; WPRE: „post-transcriptional regulatory element“ des „Woodchuck hepatitis virus“.



## **2.2 Kultivierung von *E. coli***

### **2.2.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen**

Für die Präparation von Plasmid-DNA der retroviralen Vektoren wurden *E. coli*-Zellen aus dem „Max Efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells“-Kit von Invitrogen verwendet. Dabei handelt es sich um Zellen des Dh5 $\alpha$ -Stammes, die bereits transformationskompetent waren. Die Zellen wurden routinemäßig in Luria-Bertani-Medium („LB-Broth-Base“) kultiviert. Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurde LB-Agar verwendet. In beiden Fällen handelt es sich um pulverige Fertigmischungen, die entsprechend den Herstellerangaben mit Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert wurden.

Für die selektive Aufzucht von *E. coli*-Stämmen, die Antibiotika-Resistenzen trugen, wurde dem Nährmedium, nachdem es auf ca. 50°C abgekühlt war, Ampicillin (100  $\mu$ g/ml; Stammlösung: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugefügt. Die Bakterien wurden in 14 ml FALCON-Polypropylen-Röhrchen (Becton Dickinson), Erlenmyerkolben oder Petrischalen bei 37°C kultiviert.

### **2.2.2 Stammhaltung**

Zur Herstellung einer Glycerinkultur wurden 5 ml LB-Medium, das mit Ampicillin versetzt worden war, mit einer Einzelkolonie von einer frischen LB-Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 U/min inkubiert. Am folgenden Tag wurden 600  $\mu$ l Bakterienkultur in ein Stammhaltungsröhrchen mit 1 ml sterilem 80%igem (v/v) Glycerin gegeben und durchmischt. Anschließend wurde die Glycerinkultur bei -80°C gelagert.

### **2.2.3 Messung der optischen Dichte**

Die Dichte der *E. coli*-Zellen in einer Flüssigkultur wurde anhand der scheinbaren optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) mit Hilfe eines „Lightwave S2000 UV/VIS Diode-Array-Spectrophotometers“ ermittelt. Nach der

Messung konnte die in der Kultur vorhandene Zellmasse durch folgende Formel errechnet werden: Zellmasse (gr) =  $OD_{600} \times \text{Kulturvolumen (ml)}$ .

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$

Für die Transformation der Plasmid-DNA der retroviralen Vektoren wurden *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. Zunächst wurden 50  $\mu$ l Bakteriensuspension und 5 ng bis 10 ng Plasmid in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß vereinigt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 37°C, gefolgt von einer 2minütigen Kühlung auf Eis. Nun wurden die Zellen in 950  $\mu$ l LB-Medium überführt und der Ansatz 1 h bei 37°C mit 225 U/min geschüttelt. Abschließend wurden von dem Ansatz verschiedene Volumina von 10  $\mu$ l bis 200  $\mu$ l auf selektiven LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert. Von diesen Platten wurden einzelne Kolonien gepickt und Übernachtskulturen (5 ml LB-Medium für Mini-Präparationen bzw. 250 ml LB-Medium für Maxi-Präparationen mit jeweils 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) für eine anschließende Plasmidpräparation angelegt.

### 2.3.2 Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly [Birnboim und Doly, 1979]. Wenn kleinere DNA-Mengen benötigt wurden, erfolgte die Isolierung der Plasmide, ausgehend von einer 5 ml-Übernachtskultur, mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach den Angaben des Herstellers. Für die präparative Aufreinigung größerer Plasmid-Mengen wurde, ausgehend von einer 250 ml-Übernachtskultur, das „Endofree Plasmid Kit“ der Firma Sigma nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde stets mit Aqua bidest. eluiert. Quantität und Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurden sowohl spektrophotometrisch als auch mittels analytischem Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese überprüft.

### 2.3.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäure-Moleküle von Faktoren wie ihrer Größe und Konformation, aber auch von der Agarosekonzentration des Gels und der elektrischen Feldstärke ab. Abhängig davon, wie groß die aufzutrennenden DNA-Fragmente waren, wurden Agarose-Konzentrationen zwischen 1% (w/v) und 2% (w/v) verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte nach Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.*, 1989]. Das Agarosepulver wurde in 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht. Danach wurde die Agaroselösung mit 2 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml) versetzt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Von der aufzutrennenden DNA-Probe wurden 10 µl mit 1/6 Volumen „6 x Loading Dye Solution“ versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Um sowohl die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente, als auch die aufgetragene DNA-Menge abschätzen zu können, wurden kommerzielle Größenstandards verwendet. Ein Standard war der „Mass Ruler DNA Ladder Mix“, der einen Größenbereich von 80 bis 10000 bp umfaßte, und auch zur Bestimmung der aufgetragenen DNA-Menge verwendet wurde. Als weitere Größenstandards dienten „Gene Ruler 100 bp DNA Ladder“, der bei der Auftrennung von Fragmenten mit einer Größe zwischen 100 und 1000 bp verwendet wurde, und „Lambda DNA / Hind III DNA Marker“, der einen Größenbereich zwischen 125 und 23130 bp abdeckte. Nach dem Gellauf wurde das Gel unter UV-Belichtung und Verwendung eines Orangefilters auf Polaroidfilm Typ 667 ISO3000/DIN36 fotografiert.

### 2.3.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration wässriger Nukleinsäure-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem „Lightwave S2000 UV/VIS Diode-Array-Spectrophotometer“ bestimmt. Für eine  $OD_{260}$  von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm wurde eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml [Sambrook *et al.*, 1989] angenommen. Darüber hinaus wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, da sich aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  die Proteinkontamination der Lösung abschätzen ließ. Es wurde ausschließlich DNA mit einem  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 verwendet.

## **2.4 Zellkulturtechniken**

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Plastikwaren waren entweder herstellerseitig steril oder wurden durch entsprechende Methoden (Autoklavieren, Sterilfiltration) vor der Benutzung sterilisiert.

### **2.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären Zellen und Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit geeignetem Kulturmedium bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen oder aber spätestens bei mikroskopisch festgestellter Konfluenz in ein neues Kulturgefäß überführt. Dabei wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 3 - 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml bis 1,5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung auf die Zellen gegeben. Nach einigen Minuten Inkubation bei RT oder 37°C lösten diese sich vom Gefäßboden ab, und der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe von Medium mit 10 - 20% FKS gestoppt. Ein Aliquot, typischerweise 1/3 bis 1/20 der Zellen, wurde nach Resuspendierung in eine neue, mit Gelatine beschichtete Kulturflasche mit frischem Kulturmedium überführt. Zur Beschichtung mit Gelatine wurde der Boden des Kulturgefäßes mit 3 ml bis 5 ml einer 0,2%igen Gelatine/PBS Lösung bedeckt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend abgesaugt. Die primären mesenchymalen Stammzellen und die Feeder-Zelllinie CD40L-L wurden mit ACCUTASE-Fertiglösung anstatt mit der Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung vom Gefäßboden abgelöst.

### **2.4.2 Neomycin-Selektion von 293T-Zellen**

Bei 293T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die sich sehr effizient transfizieren lassen und daher besonders gut für die Produktion retroviraler Partikel geeignet sind. Ursprünglich leiten sie sich von 293-Zellen ab, exprimieren

aber im Gegensatz zu diesen stabil das SV40 Large-T-Antigen [DuBridge et al., 1987]. Daher können Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung (ORI) besitzen, in 293T-Zellen zusätzlich durch das T-Antigen repliziert werden, was letztendlich eine gesteigerte Genexpression zur Folge hat. Das T-Antigen wurde über ein Plasmid mit einer Neomycin-Resistenz in die Zellen eingebracht. Die 293T-Zellen wurden aus diesem Grund in regelmäßigen Abständen G418-selektioniert (0,8 mg/ml). Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen in Gegenwart von G418 kultiviert, anschließend expandiert und zuletzt aliquotiert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.4.3 Mitomycin C-Behandlung**

Mitomycin C ist ein Antibiotikum, das zwischen die beiden Stränge der DNA interkaliert. Die DNA-Stränge werden auf diese Weise kovalent gebunden und eine Dissoziation, wie sie für die Transkription notwendig ist, verhindert. Grundlegende zelluläre Vorgänge, wie die Zellteilung, können daher nicht mehr stattfinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Vorfeld von Transduktionsversuchen CD40L-L-Zellen mit Mitomycin C behandelt. Dazu wurden die Zellen zunächst ihrem Kulturgefäß entnommen und für 5 min mit 1500 U/min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml zusatzfreiem RPMI-1640 resuspendiert und Mitomycin C (10  $\mu\text{g/ml}$ ; Stammlösung: 1 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Daran schloss sich ein erster Waschschriff mit 10 ml zusatzfreiem RPMI-1640 an, gefolgt von einem zweiten Waschschriff mit 10 ml PBS. Abschließend wurden die Zellen in RPMI-1640 (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (P/S)) aufgenommen, mit Hilfe von Trypanblau gezählt und in gewünschter Zelldichte ausgesät, um einen konfluenten Monolayer zu erhalten. Die so behandelten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  gelagert.

### **2.4.4 Gewinnung primärer Zellen**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten  $\text{CD34}^+$ -Zellen wurden aus durch Zugabe von Zytokinen mobilisiertem peripheren Blut, das aus Proben von Apheresaten stammte, isoliert. Zunächst wurde die erhaltene Probe, die in der Regel ein Volumen

von 2 ml bis 5 ml hatte, mit PBS 1:20 verdünnt. Im Anschluß wurden 20 ml „Ficoll-Paque-Plus“, das im 50 ml Röhrchen vorlag, vorsichtig mit 30 ml der verdünnten Probe überschichtet und für 50 min mit 1500 U/min zentrifugiert. Nach dieser Dichtegradienten-Zentrifugation wurde die Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen CD34-Puffer aufgenommen und mit Hilfe des „Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyzer“ die Zellzahl bestimmt. Für die Aufreinigung der CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde das „Indirect CD34 MicroBead Kit“ zusammen mit dem Zellseparator „MidiMACS“ und den „LS“-Säulen nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser magnetischen Zellseparierung werden in einem ersten Schritt die spezifisch auf den anzureichernden Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle mit Antikörpern markiert. Diese Antikörper werden anschließend mit paramagnetischen Eisenkügelchen („microbeads“) markiert. Die mit den Microbeads-Antikörper-Komplexen markierten Zellen lassen sich über ein starkes Magnetfeld, welches durch eine Metallmatrix-Säule mit einem starken Permanentmagneten erzeugt wird, effizient und schonend anreichern. Die Effizienz der Aufreinigung wurde im Anschluß durchflusszytometrisch durch die Markierung mit PerCP-gekoppeltem CD45-Antikörper und FITC-gekoppeltem CD34-Antikörper bestimmt. Zusätzlich wurde noch mit PE-gekoppeltem CD38-Antikörper gefärbt, um den Anteil an sehr frühen Vorläuferzellen abzuschätzen.

Mononukleäre AML- und ALL-Zellen wurden aus Knochenmarkpunktaten oder peripherem Blut isoliert. Dazu wurde die erhaltene Probe ca. 1:5 mit PBS verdünnt und wie bereits oben beschrieben auf „Ficoll-Paque-Plus“ aufgeschichtet. Nach einer Dichtegradienten-Zentrifugation für 50 min mit 1500 U/min wurde die Interphase abgenommen, die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verwendung in einem geeigneten Volumen IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) aufgenommen.

#### **2.4.5 Herstellung von Kryokulturen**

Für die dauerhafte Konservierung von Zellen wurden diese zunächst in einem Einfriermedium, das mit 45% (v/v) FKS und 10% (v/v) DMSO versetzt worden war, gründlich resuspendiert. Anschließend wurden sie in 1 ml-Fractionen aufgeteilt und in einem Einfrierbehälter, der Isopropanol enthielt, langsam auf -80°C abgekühlt.

Danach wurden die Kryokulturen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und danach sofort in 5 ml FKS überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1500 U/min. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 5 - 10 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen, in eine T25- oder eine T75-Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

#### **2.4.6 Transiente Erzeugung retrovirushaltiger Überstände**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl foamyvirale, als auch lentivirale Viruspräparationen transient generiert. Die Herstellung dieser retroviralen Präparationen erfolgte mit Hilfe einer  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion von 293T-Zellen [Dubridge et al., 1987]. Dafür wurden zunächst  $5 \times 10^6$  Zellen auf einer 10 cm-Gewebekulturplatte in DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 20 mM HEPES) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 h bei 37°C mit einem Mix aus Vektor-DNA und  $\text{CaPO}_4$ -Transfektionsreagenz plus 25  $\mu\text{M}$  Chloroquin transfiziert [Soneoka et al., 1995]. Sowohl bei dem foamyviralen und lentiviralen Zweiplasmidsystem, als auch beim foamyviralen Vierplasmidsystem wurden von jedem Plasmid jeweils 10  $\mu\text{g}$  in den Transfektionsmix eingesetzt. Im Fall des lentiviralen Vierplasmidsystems wurden 6  $\mu\text{g}$  von dem Plasmid pMD.G, 5  $\mu\text{g}$  von dem Vektor pRSV-Rev, 10  $\mu\text{g}$  von dem Plasmid pMDlg/pRRE, sowie 20  $\mu\text{g}$  von dem Vektor pRRL.PPT.SF.GFPpre verwendet. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in 10 ml IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) plus 10 mM Natriumbutyrat für 8 h inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium abgenommen und durch 7 ml frisches IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) ersetzt. Der Virusüberstand wurde dann am folgenden Tag von den Platten abgenommen, gefiltert (0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße) und bei -80°C gelagert.

Für die Generierung hochtitriger viraler Überstände wurden anfangs verschiedene Transfektionsreagenzien mit der  $\text{CaPO}_4$ -Methode verglichen. Dabei kamen folgende Reagenzien zum Einsatz: FuGene 6, Polyfect, Lipofectamine 2000 und jetPEI. Für diese vergleichenden Transfektionsversuche wurden entweder das foamyvirale oder das lentivirale Zweiplasmidsystem benutzt. Die Verwendung der einzelnen

Transfektionsreagenzien erfolgte entsprechend den Herstellerangaben, um die bestmöglichen Resultate hinsichtlich des Virustiters für jedes Reagenz zu erhalten. Dies kam im Aussäen verschiedener Zellzahlen und dem Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen zum Ausdruck. So wurden für Polyfect und jetPEI  $3 \times 10^6$ , für FuGENE 6  $4 \times 10^6$  und für Lipofectamine 2000  $7 \times 10^6$  293T-Zellen am Tag vor der Transfektion ausgesät.

Für die Transfektion mit FuGENE 6 wurden 40 µl Transfektionsreagenz mit serum- und antibiotikumfreiem DMEM gemischt und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese Mischung tropfenweise zu einem DNA-Mix, der 5 µg von jedem benötigten Plasmid enthielt, hinzugegeben. Der Transfektionsmix, der nun ein Gesamtvolumen von 300 µl hatte, wurde vorsichtig gemischt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt auf die Zellen gegeben. Bei der Transfektion mit Polyfect wurde ein Gemisch, das 5 µg von jeder Plasmid-DNA enthielt, zunächst mit zusatzfreiem DMEM auf 230 µl aufgefüllt und anschließend mit 70 µl Transfektionsreagenz gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion mit jetPEI wurden 5 µg von jedem zu verwendenden Plasmid gemischt und mit 150 mM NaCl auf 500 µl aufgefüllt. Zudem wurden 20 µl jetPEI mit 150 mM NaCl auf 500 µl aufgefüllt. Beide Ansätze wurden gemischt und anschließend die jetPEI-Verdünnung zu dem DNA-Mix hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde nun für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und durch 4 ml DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 20 mM HEPES) ersetzt. Dann wurden die 1 ml Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropfelt. Es folgte eine Inkubation für 6 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurden die 5 ml Transfektionsmix mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt. Für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 wurden von jedem benötigten Vektor 12 µg vereint und dann mit zusatzfreiem DMEM auf 1,5 ml aufgefüllt. Zudem wurden 60 µl Transfektionsreagenz mit serum- und antibiotikumfreiem DMEM auf ein Volumen von 1,5 ml verdünnt und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lipofectamine 2000-Verdünnung mit dem DNA-Mix vereint, vorsichtig gemischt und anschließend für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt und 2 ml zusatzfreies DMEM auf die 293T-Zellen gegeben. Nun wurden die 3 ml Transfektionsmix vorsichtig auf die Platte getropfelt,



gefolgt von einer Inkubation für 6 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden zu den 5 ml auf der Platte weitere 10 ml DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin und 20 mM HEPES) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Inkubation mit Natriumbutyrat und die Ernte der viralen Überstände an den beiden folgenden Tagen erfolgte für alle vier Transfektionsreagenzien wie bereits oben beschrieben. Allerdings wurden die retroviralen Partikel nicht in 7 ml frischem IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) aufgenommen, sondern in 10 ml.

#### **2.4.7 Produktion retroviraler Überstände mit Hilfe von stabilen Produzentenzellen**

Für die Herstellung gammaretroviraler Überstände wurden „PGS11EG“-Zellen verwendet. Diese sich von PG13-Zellen ableitende Produzentenzelllinie generiert MSCV-EGFP Vektoren, die mit dem GALV-Hüllprotein pseudotypisiert sind. Als Markergen diente auch hier *EGFP*, das in diesem Fall unter der Kontrolle eines hybriden SFFV/MESV-Promotorkonstrukts steht. Für die Produktion der gammaretroviralen Überstände wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml DMEM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 20 mM HEPES) pro 10 cm Platte ausplattiert. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das alte Medium entfernt und durch 10 ml IMDM mit 20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml P/S ersetzt, um das optimale Kulturmedium für die spätere Transduktionsphase von primären humanen hämatopoetischen Zellen zu erhalten. Nach weiteren 24 h, 48 h und 72 h wurde der Überstand abgenommen, filtriert (0,45 µm Porengröße) und bei –80°C gelagert.

#### **2.4.8 Titration retrovirushaltiger Überstände**

Der Virustiter dient zum Abschätzen der Anzahl der Viruspartikel, die pro Volumeneinheit im Überstand enthalten ist. In dieser Arbeit konnte der Titer der hergestellten Überstände mit Hilfe des Markergens *EGFP*, das von allen

verwendeten viralen Vektoren exprimiert wurde, ermittelt werden. Als Zielzellen für die Titration wurden HT1080-Zellen verwendet.

Zu Beginn der Titration wurden  $3,5 \times 10^4$  Zellen in 2 ml IMDM (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml P/S) je Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nachdem am folgenden Tag die Zellzahl pro Vertiefung bestimmt worden war, erfolgte die Transduktion der Zellen für 4 h mit unterschiedlichen Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, und 1:1000) der Überstände. Dabei wurden von jeder Verdünnung zwei Ansätze für eine Doppelbestimmung hergestellt und pro Ansatz 1 ml unverdünnter bzw. verdünnter Überstand eingesetzt. Bei der Titration von lentiviralen oder gammaretroviralen Überständen wurde jeder Ansatz zusätzlich mit 8 µg/ml Polybrene supplementiert. Bei der Titration von foamyviralen Überständen wurde auf diese Zugabe verzichtet [Russell und Miller, 1996]. Nach der vierstündigen Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere drei Tage in Kultur gehalten. Abschließend wurden die Zellen geerntet, für 30 min bei RT mit 3,8%igem Formalin in PBS fixiert und durchflusszytometrisch hinsichtlich des Anteils an EGFP<sup>+</sup>-Zellen analysiert. Der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen folgend, wurde mit Hilfe der folgenden Rechnung auf die zum Zeitpunkt der Transduktion je ml Überstand enthaltenen infektiösen Einheiten abgeschätzt:

$\text{Titer [IE/ml]} = \text{Zellzahl (Zeitpunkt der Transduktion)} \bullet \text{Anteil transduzierter Zellen} \bullet \text{Verdünnungsfaktor}$

#### **2.4.9 Beschichtung von Kulturgefäßen mit RetroNektin<sup>®</sup>**

Die Transduktion von Zelllinien und primären hämatopoetischen Zellen erfolgte in Kulturgefäßen (NTC, non tissue culture, nicht für die Gewebekultur vorbehandelt) die mit RetroNektin<sup>®</sup> beschichtet worden waren (4 µg/cm<sup>2</sup> in PBS). Die Beschichtung mit RetroNektin<sup>®</sup> erfolgte wahlweise über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Bei RetroNektin<sup>®</sup> handelt es sich um ein rekombinantes Fibronektinfragment, das virus- und zellbindende Domänen [Moritz et al., 1996] besitzt und zur Steigerung der Transduktionseffizienz eingesetzt wird. Vor der Transduktion wurden die Kulturgefäße einmal mit PBS gewaschen und zur Absättigung noch freier Bindestellen auf den Oberflächen mit PBS/2% BSA für 20 min inkubiert, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS.

## **2.4.10 Transduktion hämatopoetischer Zellen**

### **2.4.10.1 Transduktion hämatopoetischer Zelllinien**

Für die Transduktion wurden 40.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie in 2 ml virushaltigem Überstand aufgenommen und in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert, die zuvor mit Retronektin<sup>®</sup> beschichtet worden war. Nach einer 6stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der retrovirale Überstand durch 2 ml frisches RPMI-1640 (10% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) ersetzt. An den beiden folgenden Tagen wurden die Zellen erneut für 6 h in Gegenwart retrovirushaltiger Überstände inkubiert. Etwa 24 h nach der dritten Transduktionsrunde wurden die Zellen geerntet und die Höhe der *EGFP*-Genexpression per FACS-Analyse bestimmt.

### **2.4.10.2 Transduktion primärer Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedlich lange Transduktionszeiten vergleichend getestet, um auf diese Weise das optimale Protokoll für jedes virale Vektorsystem zu ermitteln. Aufgereinigte CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden entweder prästimuliert oder unstimuliert für die Transduktionsversuche verwendet. Die Prästimulation erfolgte für 24 h mit 100 ng/ml Stammzellfaktor (SCF), 1 x 10<sup>3</sup> U/ml Granulozyten-koloniestimulierender Faktor (G-CSF), 100 ng/ml Trombopoetin (TPO) und 100 ng/ml flt-3-Ligand (Flt-3) in IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin). Für die Transduktion der stimulierten oder unstimulierten Zellen wurde die gewünschte Zellzahl für 5 min bei 1500 U/min abzentrifugiert und das Zellsediment in 2 ml des jeweiligen retroviralen Überstandes resuspendiert. Der Transduktionsansatz wurde dann noch mit 100 ng/ml SCF, 1 x 10<sup>3</sup> U/ml G-CSF, 100 ng/ml TPO und 100 ng/ml Flt-3 supplementiert und für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach folgte ein Medienwechsel, bei dem der retrovirale Überstand durch 2 ml frisches IMDM mit 20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin und den bereits genannten Zytokinen ersetzt wurde. Die transduzierten Zellen wurden 24 h nach diesem Medienwechsel geerntet, mit PE-gekoppeltem CD34- und PerCP-gekoppeltem CD45-Antikörper gefärbt und

die Gentransfereffizienz anhand der *EGFP*-Markergenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Alternativ zu dieser 16stündigen Transduktion wurden prästimulierte Zellen an drei konsekutiven Tagen für jeweils 6 h in retroviralem Überstand und mit Zytokinen inkubiert. Dabei wurde nach jeder Transduktionsrunde der Überstand durch frisches Medium und frische Zytokine ersetzt. Auch in diesem Fall erfolgte 24 h nach dem letzten Medienwechsel die durchflusszytometrische Analyse der *EGFP*-Expression. Transduktionen wurden in Vertiefungen von 6-Loch-NTC-Platten durchgeführt, die mit RetroNektin<sup>®</sup> beschichtet und mit 2 ml retroviralem Überstand beladen worden waren. Hierzu wurde in eine mit RetroNektin<sup>®</sup> beschichtete Vertiefung 1 ml retroviraler Überstand gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde der alte Überstand abgenommen und durch 1 ml frischen Überstand ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Überstand abgenommen und der Transduktionsansatz in die Vertiefung gegeben.

Mononukleäre Leukämie-Zellen wurden wie die physiologischen Vorläuferzellen entweder stimuliert oder unstimuliert für die Transduktionsversuche verwendet. Die Prästimulation erfolgte für 24 h mit 100 ng/ml SCF, 1 x 10<sup>3</sup> U/ml G-CSF und 100 ng/ml Flt-3 in IMDM (20% FKS, 2 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin), die Transduktion für 16 h in 1 ml oder 2 ml viralem Überstand und Zytokinen. Die Vertiefungen der 6-Loch-NTC-Platten, in denen die Transduktionen durchgeführt wurden, waren ebenfalls mit RetroNektin<sup>®</sup> beschichtet und mit 1 ml bis 2 ml retroviralem Überstand beladen worden. ALL-Zellen wurden alternativ während der Prästimulation und der Transduktion auch auf einem Monolayer von CD40L-L – Zellen und in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren kokultiviert. Bei der Transduktion auf dem Monolayer wurde dem Ansatz zudem 8 µg/ml Polybrene hinzugefügt. Dieses kationische Polymer neutralisiert die negativen Oberflächenladungen von Membranen und erleichtert somit die Infektion von Zellen durch Retroviren [Davis et al., 2004]. Die transduzierten Zellen wurden 24 h nach dem letzten Medienwechsel geerntet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und die Höhe der *EGFP*-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Im Rahmen der *in-vivo*-Versuche wurden prästimulierte AML-Zellen in 5 ml retroviralem Überstand aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurden 2 ml frisches Medium und Zytokine hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde auf eine mit RetroNektin<sup>®</sup> beschichtete und mit Überstand beladene 10 cm-NTC-Kulturschale gegeben und für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>

inkubiert. Das Beladen der beschichteten Kulturschale erfolgte, indem 5 ml Überstand auf die Platte gegeben, und diese dann für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert wurde. Nach den 16 h wurden die Zellen geerntet und mit zusatzfreiem IMDM gewaschen. Abschließend wurden sie mit zusatzfreiem IMDM auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und den Versuchstieren appliziert.

Mesenchymale Stammzellen (freundlicherweise von Frau PD Dr. D. Dilloo zur Verfügung gestellt) wurden in DMEM mit 10% FKS, 1 mM L-Glu, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin und 3 ng/ml b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) kultiviert und erst dann für Transduktionsversuche verwendet, wenn eine gleichmäßige Proliferation mikroskopisch zu beobachten war. Für die Transduktion wurden entweder 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in T75-Kulturflaschen (TC) oder 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in T175-Kulturflaschen (TC) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Am folgenden Tag wurde das alte Medium abgenommen. In die T75-Kulturflaschen wurden dann 4 ml retroviraler Überstand und 2 ml frisches Medium mit b-FGF, in die T175-Flaschen 6 ml retroviraler Überstand und 4 ml frisches Medium mit b-FGF gegeben. In beiden Fällen wurden die Transduktionsansätze noch mit Polybren (8 µg/ml) supplementiert. Es folgte eine Inkubation für 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurden die verdünnten Überstände abgenommen und durch frisches Medium mit b-FGF ersetzt. Die durchflusszytometrische Bestimmung der Gentransfereffizienz erfolgte entweder ein oder vier Tage nach dem letzten Medienwechsel, indem Zellen geerntet, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend die Höhe der *EGFP*-Genexpression bestimmt wurde.

#### **2.4.11 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung und Identifikation von Zellpopulationen anhand verschiedener Eigenschaften wie zum Beispiel Zellgröße und Granularität. Außerdem erlaubt sie die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Dazu werden die Zellen im Durchflusszytometer (in dieser Arbeit auch durch den Begriff „FACS“ abgekürzt) durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom an einem Argon-Laser vorbeigeleitet. Der monochromatische Laserstrahl wird dadurch gebeugt und gestreut, was Informationen über die verschiedenen Zellcharakteristika liefert. Außerdem werden Fluorochrome, die sich an oder auf den Zellen befinden,

angeregt. Dies führt zur Abgabe von Energie in Form von Photonen, die von einem Photodetektor registriert werden und deren Konzentration proportional zur Menge an Antikörpern pro Zelle ist. Zur Analyse wurde das Durchflusszytometer Epics XL der Firma Coulter verwendet. Eine Messung umfasste 10 000 – 30 000 im FACS detektierte Ereignisse. EGFP und FITC-gekoppelte Antikörper wurden im Kanal FL1, PE-gekoppelte Antikörper im Kanal FL2, ECD-gekoppelte Antikörper im Kanal FL3 und PerCP-gekoppelte Antikörper im Kanal FL4 gemessen.

#### **2.4.12 Antikörperfärbung**

Zelluläre Oberflächenmoleküle wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen den nachzuweisenden Oberflächenmarker unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Konzentrationen angefärbt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluoreszein-Isothiocyant (FITC), Phycoerythin (PE), PE-Cy5, PE-Texas Red (auch bekannt als ECD) oder Peridinin-Chlorophyllprotein (PerCP) verwendet. Die anzufärbenden Zellen wurden zunächst in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und anschließend die Antikörper hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und dann für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und mit 3,8%igem (v/v) Formalin in PBS für 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden nochmals gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und abschließend am Durchflusszytometer analysiert.

#### **2.4.13 CFU-Assay**

Der CFU-Assay erlaubt die Detektion der klonalen Nachkommenschaft individueller Vorläuferzellen, die sich in der Gesamtheit der CD34<sup>+</sup>-Zellen befinden. Dafür werden die Zellen in einem viskosen Medium ausgesät, das Zellmigration weitgehend unterbindet. Während ausgereifte hämatopoetische Zellen gewöhnlich in Kultur innerhalb weniger Tage absterben, können Zellen, die als Nachkommen von Vorläuferzellen neu gebildet werden, Kolonien bilden. Diese sind in dem semisoliden Medium unter dem Mikroskop leicht zu identifizieren. Für den Assay wurden 1 – 4 x 10<sup>3</sup> transduzierte oder untransduzierte CD34<sup>+</sup>-Zellen in IMDM mit 0,9% Methylzellulose, 35% FKS, 10 ng/ml rh-IL 3, 20 ng/ml rh-IL 6, 20 ng/ml SCF, 6 U/ml

EPO, 1000 U/ml G-CSF und 10  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol in 35 mm-Platten als Triplikate ausgesät. Nach einer Inkubation von 10-14 Tagen in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die entstandenen *EGFP*-exprimierenden Kolonien, die aus transduzierten Vorläuferzellen hervorgegangen waren, unter einem Fluoreszenz-Stereomikroskop identifiziert und fotografiert werden.

## **2.5 *In-vivo*-Untersuchungen im NOD/SCID-Mausmodell**

### **2.5.1 Transplantation transduzierter AML-Zellen**

Die *In-vivo*-Untersuchungen wurden an NOD/LtSz-Prkdc<sup>scid</sup>/Prkdc<sup>scid</sup> (NOD/SCID)-Mäusen durchgeführt. Sowohl die Tierhaltung als auch die Versuchsdurchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Vor der Transplantation erhielten die NOD/SCID-Mäuse eine Ganzkörperbestrahlung mit einer sublethalen Dosis von 3,5 Gy. Jeder Maus wurden 0,5 bis 1,5 x 10<sup>7</sup> mononukleäre AML-Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l bis 300  $\mu$ l zusatzfreiem IMDM in die Schwanzvene injiziert. Bei den transplantierten Zellen handelte es sich um untransduzierte oder um pRRL.PPT.SF.GFPpre-transduzierte Zellen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche waren von den zuständigen Behörden geprüft und genehmigt worden.

### **2.5.2 Analyse der mononukleären Zellen aus murinem Knochenmark, Milz und Blut transplantierter Tiere**

Die Mäuse wurden 5 bis 9 Wochen nach der Transplantation aus dem Versuch genommen und durch zervikale Dislokation getötet. Jedem Tier wurde zuerst peripheres Blut und anschließend Tibia, Femur, Coxa und die Milz entnommen. In einigen Fällen wurde ein Femur für Knochenmarkquerschnitte in 3,8%igem (v/v) Formalin gelagert. Die Knochenmarkzellen wurden durch Spülen der Knochenmarkhöhlen mit zusatzfreiem IMDM unter Verwendung einer 20 ml-Spritze (BD Discardit II, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) und einer G27 x 3/4 -Kanüle

(BD Microlance 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) isoliert und anschließend durch ein 70 µm-Zellsieb (BD Falcon Cell Strainer, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) filtriert. Auch aus der Milz wurden die Zellen isoliert und durch ein 70 µm-Zellsieb filtriert. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurden die Milz-, Blut- und Knochenmark-Einzelzellsuspensionen für 5 min mit 1500 U/min zentrifugiert, jedes Zellpellet in 3,5 ml PharMLyse-Puffer (1:10-Verdünnung mit Aqua bidest. aus einer 10fach konzentrierten Stammlösung angesetzt) aufgenommen und durch vorsichtiges vortexen resuspendiert. Es folgte eine 5minütige Inkubation im Dunklen auf Eis. Danach wurden die Zellen mit geeigneten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt und fixiert. Abschließend wurde das Anwachsen humaner, transduzierter AML-Zellen in den NOD/SCID-Mäusen durchflusszytometrisch untersucht.

### **2.5.3 Histologische Untersuchungen**

Histologische Schnitte und Färbungen von murinen Femur-Knochen wurden freundlicherweise von Dr. med. Grabellus und seinen Mitarbeitern am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Essen angefertigt. Dazu wurden vier Mikrometer dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten Knochen hergestellt und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach entsprechenden Standardprotokollen angefertigt. Zusätzlich wurden immunhistologische Färbungen unter Verwendung der EnVision+ System Peroxidase Methode (DAKO) mit Maus-Antikörpern (Immunoglobulin G) gegen CD45 (Klone 2B11+PD7/26, DakoCytomation; Verdünnung 1:1000) und der Myeloperoxidase (Polyklonal, DakoCytomation; Verdünnung 1:7000) durchgeführt. Nach dieser immunhistologischen Prozedur wurden die Kerne mit Hämatoxylin für 5 min gegengefärbt.

## **2.6 Statistische Analysen**

Wenn nicht anders angegeben sind alle dargestellten Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean, entspricht dem Quotienten aus Standardabweichung und der Wurzel aus n) angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den



Gruppen wurde im Fall der Titrations von viralen Überständen und der Transduktionsversuche von hämatopoetischen Zelllinien mit Hilfe des Student'schen  $t$ -Test berechnet. Diese statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung des Programms Excel 2003. Für die Signifikanzberechnungen im Fall der Transduktionsversuche von primären CD34<sup>+</sup>- Zellen und AML-Zellen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei kam das Programm SPSS für Windows Version 14.0.1 (7. Dec 2005) zum Einsatz. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $\leq 0,05$  angesehen.

## 3 Ergebnisse

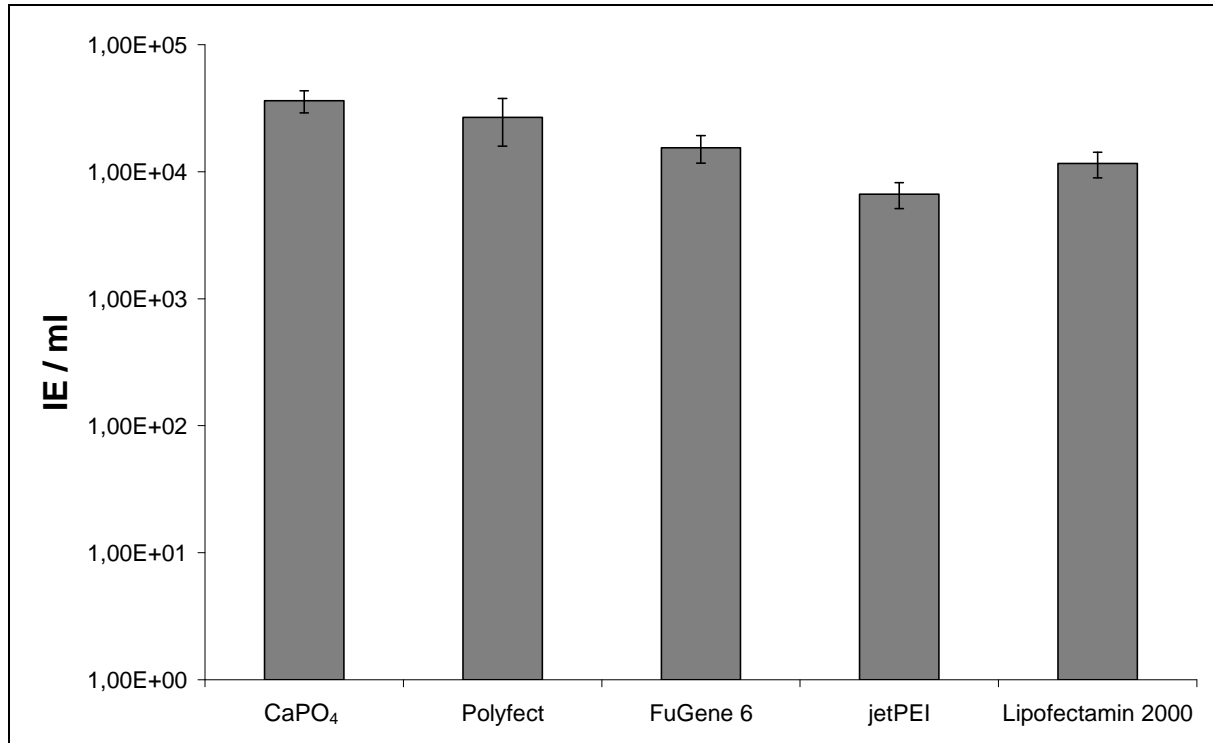
### 3.1 Produktion retroviraler Überstände

Die Produktion retrovirushaltiger Überstände kann transient oder mit Hilfe stabiler Verpackungszelllinien geschehen. So stand für die Herstellung der gammaretroviralen Überstände eine Produzentenzelllinie zur Verfügung, die sowohl die Struktur- und Hüllproteine als auch das *EGFP*-Markergen stabil exprimiert. Dies ermöglichte die Generierung retrovirushaltiger Überstände mit nur geringem zeitlichen und materiellen Aufwand. Die lenti- und foamyviralen Überstände wurden dagegen transient hergestellt. Für diese beiden Vektorsysteme sollten zunächst Transfektionsprotokolle entwickelt und optimiert werden.

#### 3.1.1 Transiente Erzeugung foamyviraler Überstände

Zur Optimierung der Virusproduktion wurden zunächst verschiedene Transfektionsmethoden miteinander verglichen. Dazu gehörte zum einen die Calcium-Phosphat-Präzipitation. Hierbei binden in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat die Nukleinsäuren an das ausfallende Calciumphosphat. Dieses Präzipitat wird dann von den Zellen mittels Endocytose aufgenommen. Außerdem wurden FuGene 6 und Lipofectamin 2000, bei denen es sich um nicht-liposomale Lipid-Formulierungen handelt, getestet. Bei der Lipotransfektion bildet sich ein Lipid-DNA-Komplex, dessen positive Nettoladung es ihm ermöglicht, die negativ geladene Zellmembran zu durchdringen. Das Polyfect-Transfektionsreagenz dagegen besteht aus aktivierten Dendrimeren, die aufgrund ihrer geladenen Aminogruppen kompakte Strukturen mit der DNA bilden. Diese positiv geladenen Komplexe binden an die negativ geladenen Oberflächenrezeptoren eukaryotischer Zellen und gelangen letztendlich über Endosomen ins Zellinnere. Bei jetPEI handelt es sich um lineares Polyethylenimin, welches mit der DNA kationische Komplexe bildet, die dann von den Zellen durch Endocytose aufgenommen werden können.

Um für jedes getestete Transfektionsreagenz die bestmöglichen erreichbaren Virustiter zu ermitteln, erfolgten die Transfektionen entsprechend den Herstellerangaben. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Protokolle ist unter Abschnitt 2.4.6 zu finden. Für den Vergleich der verschiedenen Transfektionsreagenzien wurde das foamyvirale Zweiplasmidsystem verwendet. Dieses besteht zum einen aus dem Expressionsvektor, auf dem neben dem *EGFP*-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden SFFV-Promotors auch die durch einen CMV-Promotor regulierten Strukturgene *gag* und *pol* liegen. Das zweite Plasmid enthält eine Expressionskassette für das Wildtyp-HFV-Hüllprotein. Eine genauere Beschreibung der Vektoren ist im Kapitel „Material und Methoden“ unter Punkt 2.1.8 zu finden. Die Titer der generierten Überstände wurden entsprechend den Angaben unter Punkt 2.4.8 durch die Expression des *EGFP*-Gens nach Transduktion in Zellen der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 ermittelt. Von dieser Zelllinie ist bekannt, dass sie sich besonders gut mit allen drei Vektorsystemen transduzieren lässt und daher für die Titration der Überstände geeignet ist.



**Abbildung 3-1: Vergleich von unterschiedlichen Transfektionsreagenzien bei der Herstellung foamyviraler Überstände.**

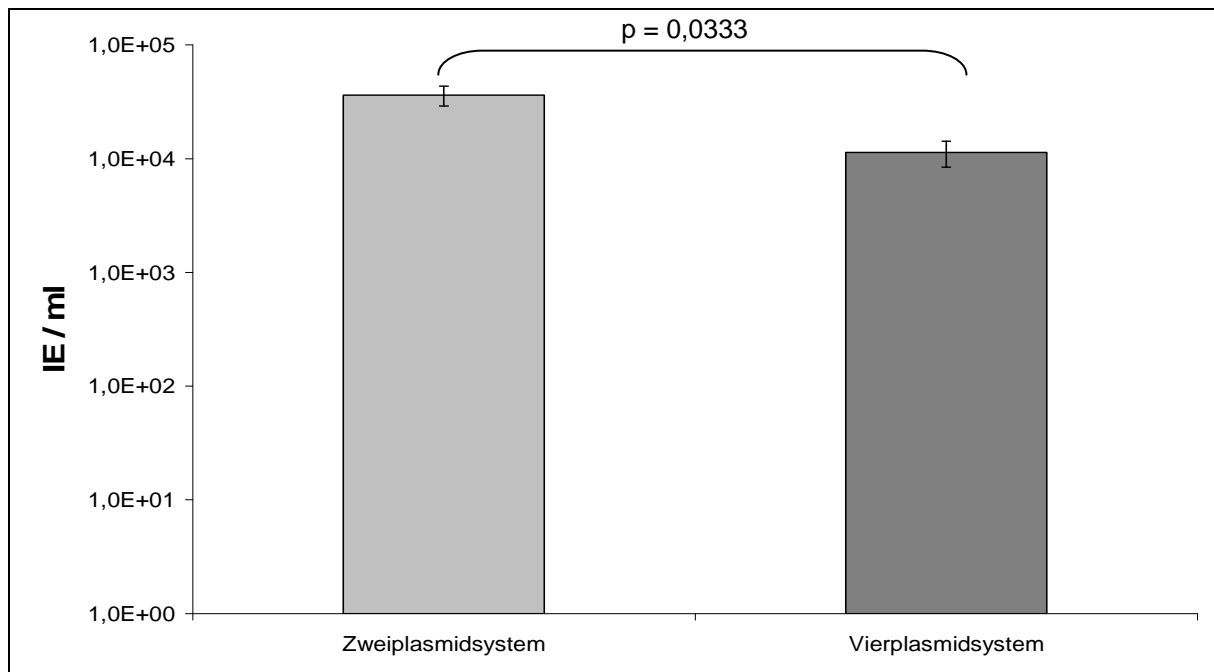
Dargestellt wird die Anzahl der infektiösen Einheiten (IE), die pro ml Überstand generiert wurden, als Mittelwert  $\pm$  SEM. Getestet wurden die Calcium-Phosphat-Präzipitation ( $3,6 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$  IE/ml; n=10), Polyfect ( $2,7 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$  IE/ml; n=8), die nicht liposomalen Lipid-Formulierungen FuGene 6 ( $1,6 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^3$  IE/ml; n=3) und Lipofectamin 2000 ( $1,2 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^3$  IE/ml; n=3), sowie jetPEI ( $6,7 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$  IE/ml; n=3).

Das Ergebnis dieser vergleichenden Transfektionsversuche wird in der Abbildung 3-1 dargestellt. Wie zu sehen ist, lagen die Titer, die mit den fünf Reagenzien generiert werden konnten, zwar alle auf etwa gleicher Höhe, fielen aber doch insgesamt recht niedrig aus. So konnten mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation ( $3,6 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$  IE/ml) und des Transfektionsreagenz Polyfect ( $2,7 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$  IE/ml) noch die besten Ergebnisse erzielt werden. Nur wenig schlechter waren dagegen FuGene 6 mit  $1,6 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^3$  IE/ml, Lipofectamin 2000 mit  $1,2 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^3$  IE/ml und jetPEI mit  $6,7 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$  IE/ml.

Im Kapitel „Material und Methoden“ wurde bereits erwähnt, dass bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation die retroviralen Vektoren am Ende in 7 ml frischem Medium aufgenommen wurden und nicht, wie bei den anderen Transfektionsreagenzien, in 10 ml. Dadurch ergab sich ein leicht verändertes Bild, wenn man die Transfektionseffizienz über die Anzahl der viralen Partikel, die pro 10 cm-Kulturplatte generiert wurden, definierte. Hierzu wurde die Anzahl der je ml Überstand enthaltenen infektiösen Einheiten mit den Millilitern Medium, in denen die Viruspartikel auf einer 10 cm-Gewebekulturplatte aufgenommen wurden, multipliziert. Es zeigte sich dabei, dass die Überstände, die mit dem Transfektionsreagenz Polyfect ( $2,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  IE/Platte) generiert wurden, minimal besser waren, als jene, die mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation ( $2,5 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$  IE/Platte) hergestellt worden waren. Allerdings ließen sich mit der  $\text{CaPO}_4$ -Methode immer noch höhere Titer erzielen als mit FuGene 6 ( $1,6 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$  IE/Platte), Lipofectamin 2000 ( $1,2 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$  IE/Platte) oder jetPEI ( $6,7 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$  IE/Platte).

Da die Calcium-Phosphat-Präzipitation es ermöglichte, mit geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand vergleichsweise hohe Titer reproduzierbar zu generieren, wurde diese Methode verwendet, um im nächsten Schritt foamyvirale Überstände unter Verwendung eines Vierplasmidsystems herzustellen. Beim foamyviralen Vierplasmidsystem liegen die Strukturgene *gag* und *pol* getrennt auf zwei Plasmiden vor. Das HFV-Hüllprotein befindet sich auf einem dritten Konstrukt. Das Expressionskonstrukt enthält das *EGFP*-Gen, welches unter der Kontrolle des SFFV-Promotors in der U3-Region steht (siehe Abschnitt 2.1.8). Durch die Aufteilung der verschiedenen genetischen Elemente auf zwei zusätzlichen Plasmiden soll die Gefahr, dass sich über Rekombinationsereignisse replikationsfähige Virenpartikel bilden, weiter minimiert werden. Die Durchführung der Transfektion erfolgte wie beim Zweiplasmidsystem. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-2 zu sehen. Insgesamt wurden

mit dem Vierplasmidsystem, das fünfmal für die Herstellung virushaltiger Überstände verwendet wurde, niedrigere Titer erzielt, als mit dem Zweiplasmidsystem, denn es wurde durchschnittlich ein Titer von nur  $1,1 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$  IE/ml erreicht. Demgegenüber wurde mit dem Zweiplasmidsystem in den zehn durchgeführten Transfektionen, die an dieser Stelle noch mal zum Vergleich dargestellt sind, durchschnittlich ein signifikant höherer Titer von  $3,6 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$  IE/ml erzielt ( $p = 0,0333$ ). Letztendlich konnten mit beiden Vektorsystemen nur sehr niedrigtitrige Überstände hergestellt werden, wobei das foamyvirale Zweiplasmidsystem noch die besseren Ergebnisse lieferte. Daher wurden dessen Überstände auch in den folgenden Transduktionsversuchen verwendet.



**Abbildung 3-2: Effizienz der Herstellung foamyviraler Partikel mit Hilfe des Zweiplasmid- und des Vierplasmidsystems.**

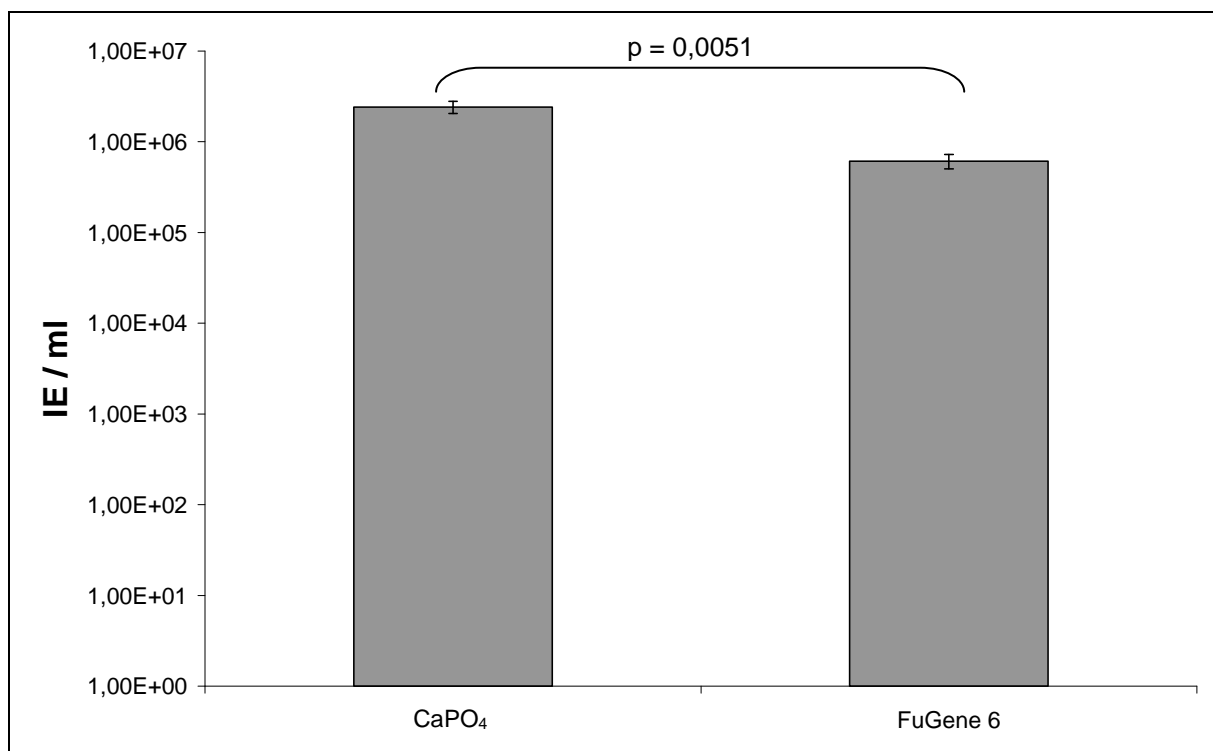
Dargestellt wird die Anzahl der infektiösen Einheiten (IE), die pro ml virushaltigem Überstand generiert wurden, als Mittelwert  $\pm$  SEM. Der linke hellgraue Balken repräsentiert die Ergebnisse des Zweiplasmidsystems ( $3,6 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$  IE/ml;  $n=10$ ) und der rechte dunkelgraue Balken zeigt die Resultate, die mit dem Vierplasmidsystem ( $1,1 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$  IE/ml;  $n=5$ ) erzielt wurden.

### 3.1.2 Herstellung lentiviraler Überstände durch transiente Transfektion

Auch die lentiviralen Überstände wurden durch eine transiente Transfektion von 293T-Zellen hergestellt. Basierend auf den in der Abbildung 3-1 dargestellten Ergebnissen wurde dafür zunächst die Calcium-Phosphat-Präzipitation als effiziente und gleichzeitig kostengünstige Technik mit dem Transfektionsreagenz FuGene 6,

bei dem es sich um diejenige der beiden Lipid-Formulierungen handelte, mit der sich im foamyviralen System die höchsten Titer erzielen ließen, verglichen (siehe Abbildung 3-1). Hergestellt wurden die lentiviralen Präparate zunächst unter Verwendung eines Zweiplasmidsystems. Zu diesem gehört zum einen ein Expressionsvektor, der neben dem *EGFP*-Reportergen auch die viralen Strukturproteine Gag und Pol enthält. Das zweite Plasmid trägt die genetische Information für das Glykoprotein des „Vesicular stomatitis virus“ (VSV), mit dem die Viruspartikel pseudotypisiert werden, um einen größeren Wirts- und Gewebetropismus zu erreichen (siehe Abschnitt 2.1.8).

Wie in Abbildung 3-3 zu sehen ist, konnten mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation reproduzierbar lentivirale Überstände generiert werden, deren Titer signifikant höher waren, als diejenigen, die mit FuGene 6 hergestellt worden waren ( $p = 0,0051$ ). So lagen nach Transfektionen, die unter Verwendung von  $\text{CaPO}_4$  durchgeführt worden waren, die erreichten Titer durchschnittlich bei  $2,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^5$  IE/ml. Das Transfektionsreagenz Fugene 6 erreichte dagegen im Mittel nur  $6,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  IE/ml. Wie beim foamyviralen System, hatte sich auch hier die  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion als eine effiziente Methode zur Herstellung viraler

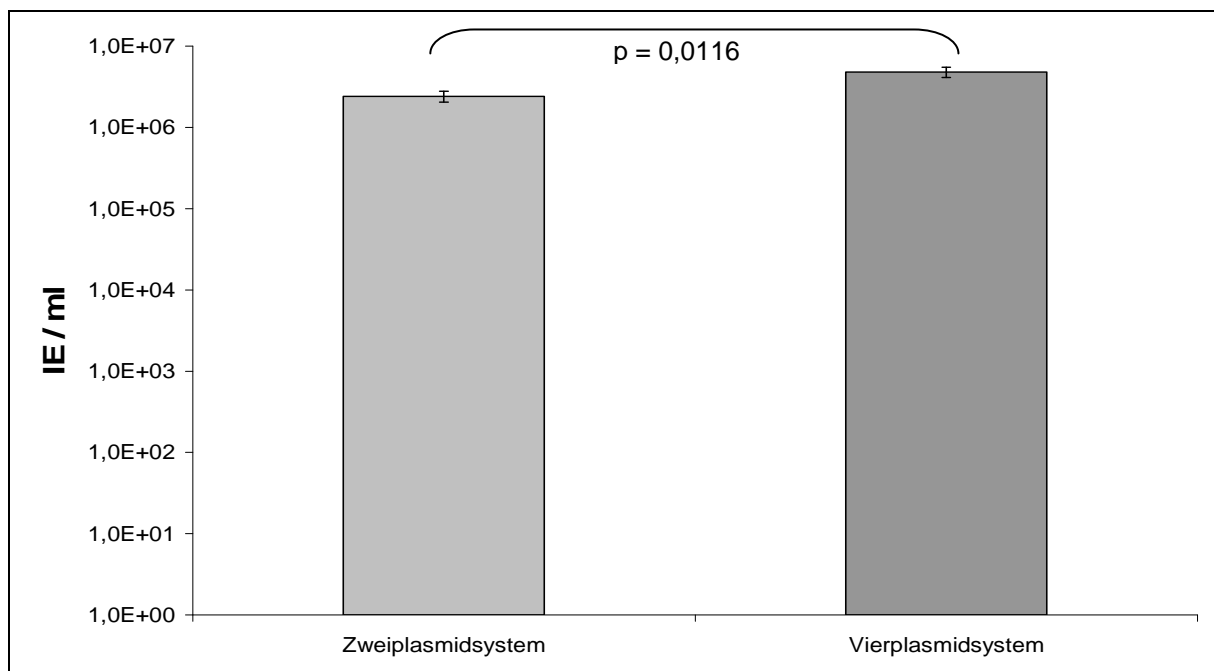


**Abbildung 3-3: Ergebnis der Herstellung lentiviraler Überstände mit verschiedenen Transfektionsreagenzien.**

Dargestellt wird die Anzahl der infektiösen Einheiten (IE), die pro ml Überstand generiert wurden, als Mittelwert  $\pm$  SEM. Getestet wurden die Calcium-Phosphat-Präzipitation ( $2,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^5$  IE/ml;  $n=6$ ) und die nicht liposomale Lipid-Formulierung FuGene 6 ( $6,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  IE/ml;  $n=4$ ).

Überstände erwiesen. Allerdings waren die Titer der lentiviralen Überstände nahezu 100mal höher als die Titer, die bei den foamyviralen Transfektionen erzielt wurden. Hier lagen die höchsten Werte bei  $3,6 \times 10^4$  IE/ml ( $\text{CaPO}_4$ ) und  $2,7 \times 10^4$  IE/ml (Polyfect).

Auch im Fall der lentiviralen Transfektion wurden bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation die retroviralen Vektoren am Ende in nur 7 ml frischem Medium aufgenommen und nicht, wie bei den anderen Transfektionsreagenzien, in 10 ml. Allerdings gab es hier keine großen Veränderungen, wenn man die Transduktionseffizienz auf die Anzahl der generierten viralen Partikel pro Kulturplatte bezog. Waren die Titer der  $\text{CaPO}_4$ -Transfektionen zuvor etwa viermal so hoch, wie die der Überstände, die mit FuGene 6 hergestellt worden waren, lagen sie nach der Umrechnung noch etwa dreimal höher. So wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation durchschnittlich  $1,7 \times 10^7 \pm 2,6 \times 10^6$  IE/Platte generiert. Das Transfektionsreagenz Fugene 6 erreichte dagegen im Mittel nur  $6,1 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$  IE/Platte.



**Abbildung 3-4: Effizienz der Herstellung lentiviraler Partikel mit Hilfe des Zweiplasmid- und des Vierplasmidsystems.**

Dargestellt wird die Anzahl der infektiösen Einheiten (IE), die pro ml virushaltigem Überstand generiert wurden, als Mittelwert  $\pm$  SEM. Der linke hellgraue Balken repräsentiert die Ergebnisse des Zweiplasmidsystems ( $2,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^5$  IE/ml; n=6) und der rechte dunkelgraue Balken zeigt die Resultate, die mit dem Vierplasmidsystem ( $4,8 \times 10^6 \pm 6,9 \times 10^5$  IE/ml; n=6) erzielt wurden.

Aus diesem Grund wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitation auch verwendet, um lentivirale Überstände mit Hilfe eines Vierplasmidsystems herzustellen. Zu dem

lentiviralen Vierplasmidsystem gehören neben einem Konstrukt, das die Strukturgene *gag* und *pol*, sowie das *rev response element* (RRE) enthält, auch ein Plasmid, auf dem die Sequenz für das VSV-G Hüllprotein liegt, sowie ein Vektor, auf dem sich nur das *rev*-Gen befindet. Das *EGFP*-Markergen liegt auf einem Expressionsvektor, der neben einem „*rev responsive element*“ weitere genetische Elemente enthält, die bei der Partikelbildung eine Rolle spielen. Die Durchführung der Transfektion erfolgte im Wesentlichen wie beim Zweiplasmidsystem. Allerdings wurden hier von jedem Plasmid verschiedene DNA-Mengen in den Transfektionsmix eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.6). Das Ergebnis wird in Abbildung 3-4 dargestellt. Insgesamt wurde mit dem lentiviralen Vierplasmidsystem in sechs durchgeführten Transfektionsversuchen durchschnittlich ein Titer von  $4,8 \times 10^6 \pm 6,9 \times 10^5$  IE/ml erreicht. Auch das Zweiplasmidsystem wurde sechsmal für die Herstellung virushaltiger Überstände verwendet. Wie aber bereits in Abbildung 3-3 gezeigt wurde, konnte mit diesem im Mittel nur ein Titer von  $2,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^5$  IE/ml erzielt werden, der im Vergleich zum Titer des Vierplasmidsystems signifikant niedriger war ( $p = 0,0116$ ). Somit konnte durch die Verwendung des Vierplasmidsystems nochmals eine Verbesserung der lentiviralen Titer erreicht werden.

### **3.1.3 Produktion gammaretroviraler Überstände von stabilen Produzentenzellen**

Die Produktion der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten gammaretroviralen Überstände erfolgte mit der Hilfe der Produzentenzelllinie PGS11EG. Diese sich von PG13-Zellen ableitende Zelllinie generiert gammaretrovirale Partikel, die als Markergen *EGFP* tragen und mit dem Hüllprotein des „Gibbon ape leukemia virus“ pseudotypisiert sind.

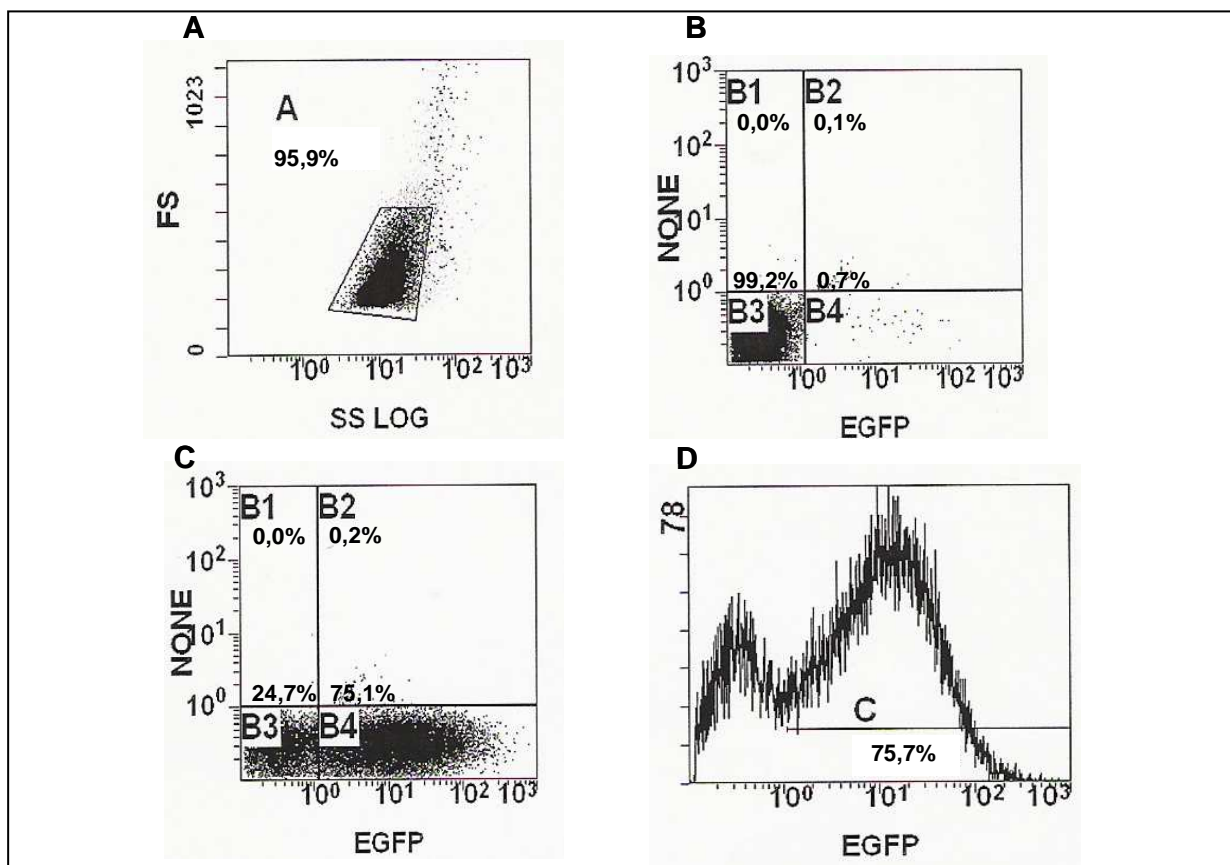
Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transduktionen wurden entsprechend den Angaben unter Punkt 2.4.7 zweimal gammaretrovirale Überstände hergestellt. Hierbei erfolgte eine erste Abnahme des viralen Überstands 24 h nach einem Medienwechsel, bei dem die Produzentenzellen in dem für die nachfolgenden Transduktionen notwendigen optimalen Kulturmedium aufgenommen wurden (24 h-Überstand). Danach gab es noch zwei weitere Überstandsabnahmen in 24 h-Abstand (48 h-Überstand und 72 h-Überstand). Die Titer der beiden Präparationen



lagen im Bereich von  $1 \times 10^5$  IE/ml. So besaßen die beiden 24 h-Überstände einen Titer von  $8,3 \times 10^4$  IE/ml und  $1,8 \times 10^5$  IE/ml. Die beiden 48 h-Überstände erreichten einen Titer von  $1,9 \times 10^5$  IE/ml und  $1,6 \times 10^5$  IE/ml, während bei den 72 h-Abnahmen die Titer bei  $2,5 \times 10^5$  IE/ml beziehungsweise  $1,7 \times 10^5$  IE/ml lagen.

### 3.2 Transduktion von hämatopoetischen Zelllinien

Die hergestellten foamy-, lenti- und gammaretroviralen Präparationen wurden in einem ersten Schritt an hämatopoetischen Zelllinien vergleichend getestet. Zum einen wurde die humane T-Zell Leukämie-Zelllinie Jurkat verwendet. Sie wurde in den späten siebziger Jahren aus dem peripheren Blut eines 14 Jahre alten Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert. Darüber hinaus wurden RS-Zellen



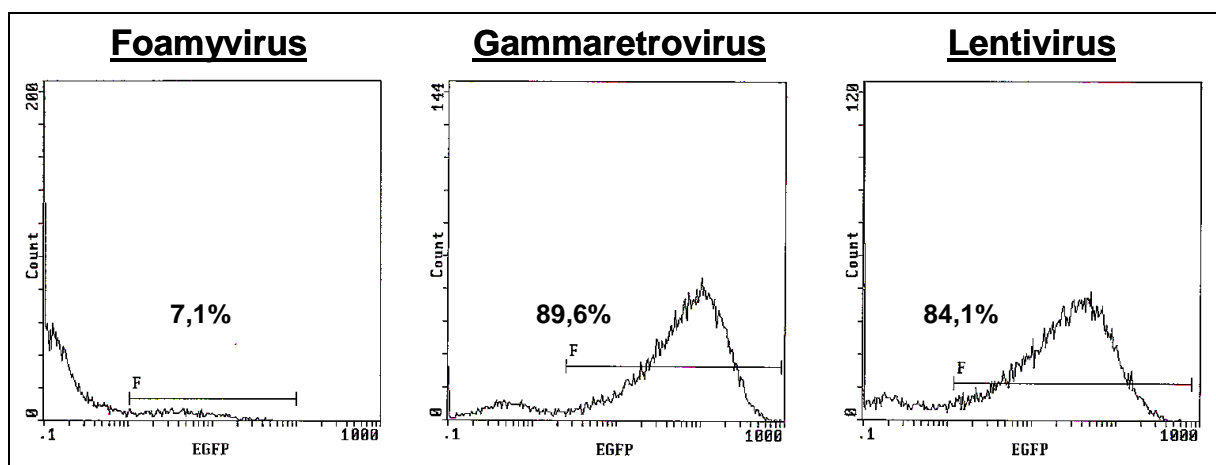
**Abbildung 3-5: Beispielaufnahmen einer durchflusszytometrischen Analyse von Jurkat-Zellen nach Transduktion mit lentiviralen Überständen.**

Bild A zeigt die Jurkat-Zellen im Vorwärts/Seitwärts-Scatter. Die lebenden Zellen wurden eingeraht. Nur bei diesen Zellen wurde die Transduktionseffizienz bestimmt. In Bild B sind untransduzierte Zellen zu sehen, die als Negativ-Kontrolle verwendet wurden. Die Bilder C und D zeigen, als Plot oder als Diagramm Jurkat-Zellen, die erfolgreich mit lentiviralen Überständen transduziert wurden. In diesem Beispiel lag der Anteil an EGFP-positiven Zellen bei etwa 75%.

verwendet. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine ALL-Zelllinie.

Im Rahmen dieser Transduktionsversuche, deren Durchführung unter Punkt 2.4.10.1 beschrieben wird, kamen ausschließlich foamy- und lentivirale Überstände zum Einsatz, die mit dem jeweiligen Zweiplasmidsystem hergestellt worden waren. Die Abbildung 3-5 zeigt am Beispiel einer Transduktion von Jurkat-Zellen mit lentiviralen Überständen das Ergebnis der durchflusszytometrischen Auswertung eines solchen Versuchs. So konnte man nach einer Transduktion, bei der die Zellen für jeweils 6 h an drei aufeinander folgenden Tagen in viralem Überstand inkubiert wurden, eine deutliche Population *EGFP*-exprimierender Zellen nachweisen.

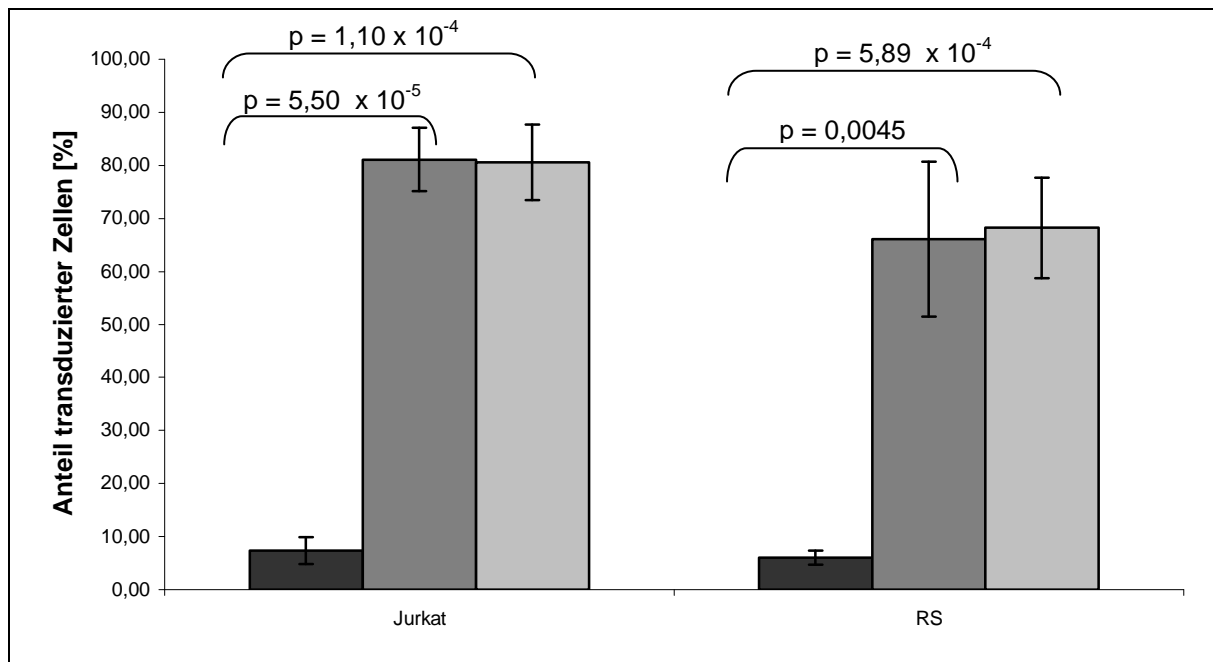
Bei der vergleichenden Analyse der unterschiedlichen Vektorsysteme war die Größe des Anteils an transduzierten Zellen abhängig vom verwendeten Vektorsystem. Dabei spiegelten die Ergebnisse der Transduktionsversuche insgesamt die Qualität der generierten Überstände wieder. Die Abbildung 3-6 zeigt dies beispielhaft anhand von Gentransferraten, die in RS-Zellen erreicht wurden. So wurden mit den foamyviralen Überständen, deren Titer im Vergleich mit denen der anderen Vektorsysteme etwa 10 bis 100mal niedriger waren, in beiden Zelllinien nur geringe Gentransferraten von unter 10% erreicht. Dagegen konnten mit den lentiviralen und gammaretroviralen Präparationen, deren Titer höher waren, Transduktionsraten von über 80% erzielt werden.



**Abbildung 3-6: Anteil an EGFP-positiven RS-Zellen nach Transduktion mit verschiedenen viralen Vektorsystemen.**

Die Abbildung zeigt beispielhaft Transduktionsraten einzelner Versuche, die mit den drei Vektorsystemen in RS-Zellen erzielt werden konnten. Wie zu sehen ist, wurden mit dem foamyviralen System nur sehr niedrige Gentransferraten von unter 10% erreicht. Im Gegensatz dazu konnte nach Transduktion mit einem der beiden anderen Vektorsysteme der Anteil an EGFP-positiven Zellen bei über 80% liegen.

Die Abbildung 3-7 faßt die Ergebnisse der einzelnen Versuche zusammen. Bei den Transduktionen der Jurkat-Zellen mit lentiviralen Überständen wurden im Durchschnitt Transduktionsraten von  $81,1 \pm 6\%$  erreicht. Auch bei der Verwendung von gammaretroviralen Präparationen lag der durchschnittliche Anteil an transduzierten Zellen bei  $80,6 \pm 7,1\%$ . Auf der anderen Seite erzielten die foamyviralen Überstände mit einer durchschnittlichen Gentransfereffizienz von  $7,4 \pm 2,6\%$  ein signifikant schlechteres Ergebnis gegenüber den lentiviralen ( $p = 5,50 \times 10^{-5}$ ) und gammaretroviralen Präparationen ( $p = 1,10 \times 10^{-4}$ ). Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch bei der Transduktion von RS-Zellen. Hier war ebenfalls bei der Verwendung von foamyviralen Überständen der Anteil an transduzierten Zellen mit  $6 \pm 1,4\%$  signifikant niedriger als bei der Verwendung von lentiviralen ( $p = 0,0045$ ) und gammaretroviralen Präparationen ( $p = 5,89 \times 10^{-4}$ ). Die lentiviralen Überstände erreichten durchschnittliche Transduktionsraten von  $66,1 \pm 14,6\%$ , während mit den gammaretroviralen Präparationen im Mittel eine Gentransfereffizienz von  $68,2 \pm 9,5\%$  erzielt wurde. Während also mit den foamyviralen Überständen wieder nur sehr geringe Transduktionsraten erzielt wurden, konnten mit den lenti- und



**Abbildung 3-7: EGFP-Expression nach Transduktion von Jurkat- und RS-Zellen mit den verschiedenen retroviralen Vektorsystemen.**

Dargestellt werden die mit den verschiedenen Vektorsystemen erreichten Transduktionsraten in Prozent EGFP-positiver Zellen als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die linke Gruppe von Balken zeigt die Gentransfereffizienzen, die in Jurkat-Zellen erreicht wurden und die rechte Gruppe zeigt die in RS-Zellen erzielten Transduktionsraten. Der linke Balken einer jeden Gruppe steht dabei für das foamyvirale, der mittlere Balken für das lentivirale und der rechte Balken für das gammaretrovirale Vektorsystem. Anzahl der Experimente: Foamyvirales Vektorsystem:  $n = 4$ ; lentivirales Vektorsystem:  $n = 3$ ; gammaretrovirales Vektorsystem:  $n = 3$ .

gammaretroviralen Präparationen identisch hohe Gentransfereffizienzen erreicht werden. Dabei waren die Transduktionsraten bei den RS-Zellen im Vergleich zu denen der Jurkat-Zellen insgesamt etwas niedriger. Somit zeigten die ersten Gentransferversuche, dass sich mit Hilfe der lenti- und gammaretroviralen Vektorsysteme hämatopoetische Zelllinien effizient transduzieren lassen.

### 3.3 Gentransfer in primäre hämatopoetische Vorläuferzellen

Um eine genauere Vorstellung vom Potential der drei Vektorsysteme zu erhalten, wurden sie anschließend in einem zweiten Schritt zur Transduktion von primären CD34<sup>+</sup>-Zellen eingesetzt. Das Arbeiten mit diesen Zellen war durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt. Die im Rahmen dieser Versuche verwendeten CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen des peripheren Blutes wurden nach *In-vivo*-Mobilisierung durch Zytokine aus kleinen Proben von Apheresaten isoliert. Das Volumen der erhaltenen Proben lag zwischen 2 und 5 ml. Dabei betrug die Gesamtzellzahl, je nach Probe, zwischen  $2,63 \times 10^9$  und  $6,65 \times 10^8$  Zellen. Der prozentuale Anteil der CD34<sup>+</sup>-Zellen an der Gesamtzellzahl wies mit Werten von 0,57% bis 8,22% ebenfalls große Schwankungen auf.

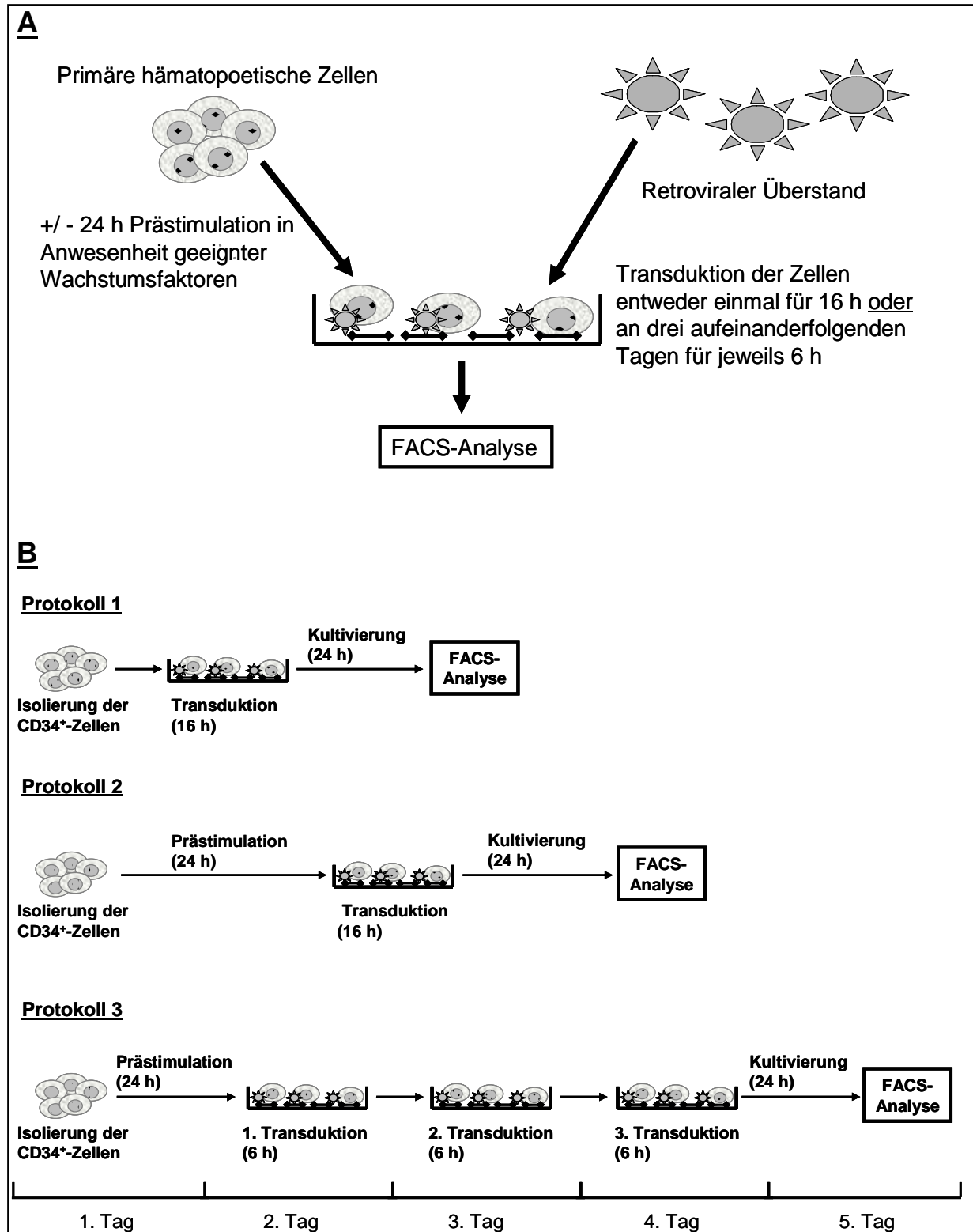
Nach der Gewinnung der CD34<sup>+</sup>-Zellen aus den Apheresat-Proben (siehe Abschnitt 2.4.4) erfolgte zunächst eine Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe von Trypanblau. Es zeigte sich, dass die Gesamtzellzahl, je nach aufgereinigter Probe, zwischen  $4,5 \times 10^6$  und  $5,25 \times 10^7$  Zellen lag. In vier von fünf Fällen waren nach der Aufreinigung nur noch zwischen 0,8% und 2% der ursprünglich eingesetzten Zellen vorhanden. In einem Fall waren es sogar nur knapp 0,4%. Um die Effizienz der Anreicherung der Vorläuferzellen zu überprüfen, wurde anschließend der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dieser lag in vier von fünf Fällen zwischen 85% und 93%. Nur in einem Fall wurde eine verhältnismäßig niedrige Reinheit von knapp 77% erreicht. Bezogen auf die initial vorhandenen CD34<sup>+</sup>-Zellen in den Apheresaten schwankten die Ausbeuten bei den einzelnen Aufreinigungen zwischen 22,5% und 85%. In Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse der einzelnen CD34<sup>+</sup>-Aufreinigungen zusammengefasst.

Die angereicherten CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden anschließend für die vergleichenden Gentransferversuche verwendet. Hierbei wurde berücksichtigt, dass sowohl

**Tabelle 3-1: Isolierung von CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen aus Stammzellapheresaten.**

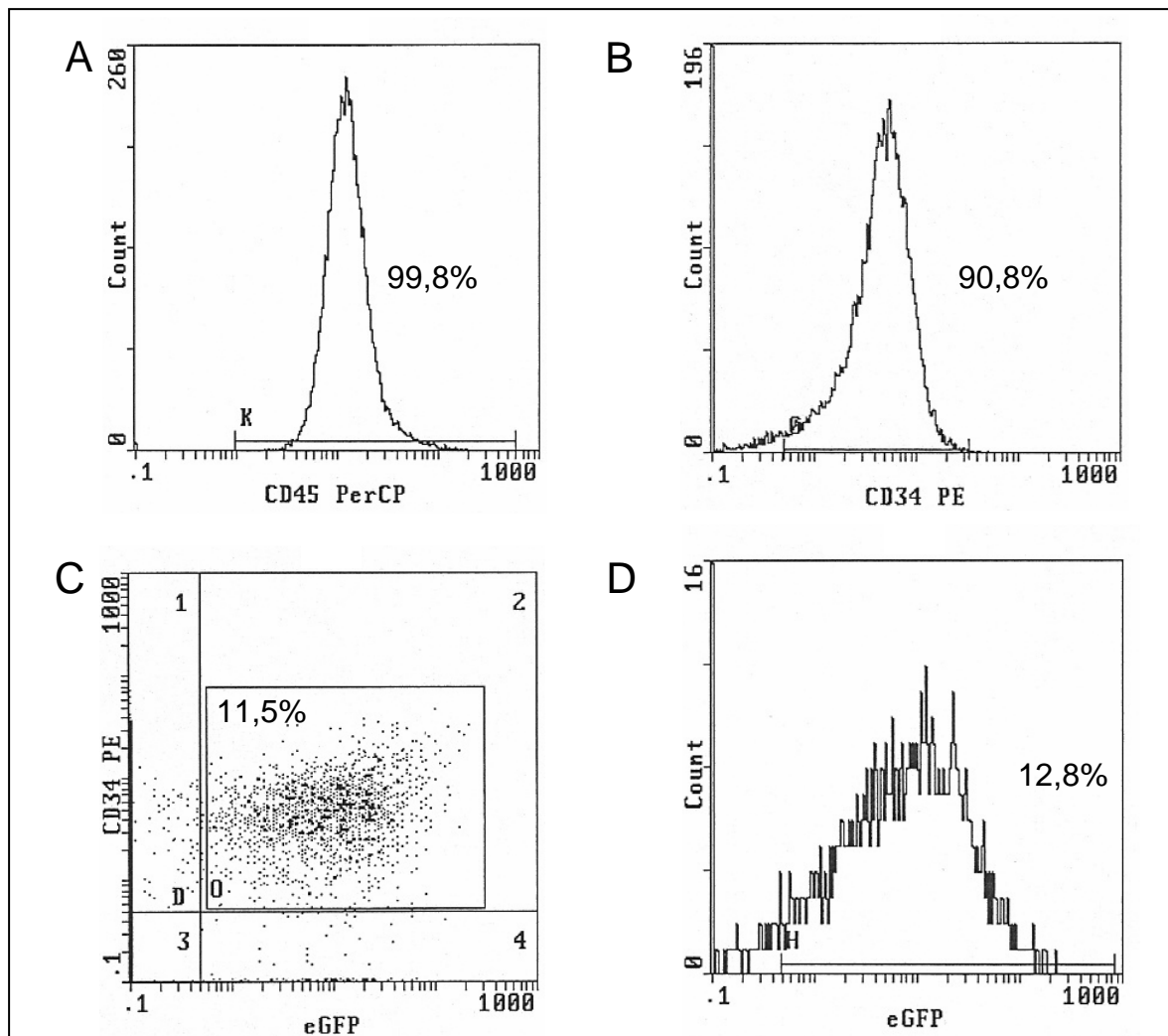
Probe Nr.	1	2	3	4	5
Volumen der Probe [ml]	5	5	2,5	2,5	2
Ausgangszellzahl gesamt (x 10 <sup>9</sup> )	2,63	0,66	0,78	1,49	1,16
CD34 <sup>+</sup> -Zellzahl gesamt (x 10 <sup>7</sup> )	21,6	0,49	2,34	1,31	0,66
Anteil an CD34 <sup>+</sup> - Zellen [%]	8,22	0,73	2,99	0,88	0,57
CD34 <sup>+</sup> -Ausbeute gesamt (x 10 <sup>7</sup> )	4,86	0,41	1,07	1,08	0,41
CD34 <sup>+</sup> -Ausbeute [%]	22,5	84,95	45,73	82,44	61,82
Reinheit der isolierten CD34 <sup>+</sup> - Fraktion [%]	92,5	76,7	85,6	86,1	90,7

Lentiviren als auch Foamyviren prinzipiell in der Lage sind, ruhende Zellen zu transduzieren, während Gamma-Retroviren nur proliferierende Zellen infizieren können. Aus diesem Grund wurden drei Transduktionsprotokolle von unterschiedlicher Dauer getestet, um das optimale Protokoll für jedes virale Vektorsystem zu ermitteln. Je nach verwendetem Protokoll wurden daher entweder unstimulierte oder prästimulierte Zellen einmal für 16 h, beziehungsweise an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 6 h transduziert (siehe Abbildung 3-8). Dabei wurden die Zellen sowohl während der Prästimulation als auch während der Transduktion in Anwesenheit von 100 ng/ml SCF, 1 x 10<sup>3</sup> U/ml G-CSF, 100 ng/ml TPO und 100 ng/ml Flt-3 kultiviert. Die Abbildung 3-9 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Bestimmung der Gentransfereffizienz, welche 24 h nach Abschluß der Transduktion erfolgte. Hierbei wurde zunächst mit Hilfe von Antikörpern die Population der humanen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen identifiziert. Innerhalb dieser



**Abbildung 3-8: Protokoll für den Gentransfer in primäre hämatopoetische Vorläuferzellen.**

Teil A: Genereller Versuchsaufbau. Dabei wurden angereicherte primäre CD34<sup>+</sup>-Zellen wahlweise zunächst mit geeigneten Wachstumsfaktoren prästimuliert und anschließend transduziert. Alternativ wurden aber auch unstimulierte Vorläuferzellen für die Gentransferversuche verwendet. Teil B: Zeitlicher Verlauf der verschiedenen Protokolle. So wurden bei Protokoll 2 die Zellen zunächst 24 h lang prästimuliert und anschließend über einen Zeitraum von 16 h transduziert, während bei Protokoll 3 die stimulierten Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 6 h transduziert wurden. Dem gegenüber wurden bei Protokoll 1 unstimulierte Zellen 16 h lang in Anwesenheit der viralen Partikel inkubiert. In allen Fällen wurde 24 h nach Abschluß der Transduktion die Höhe der EGFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt.



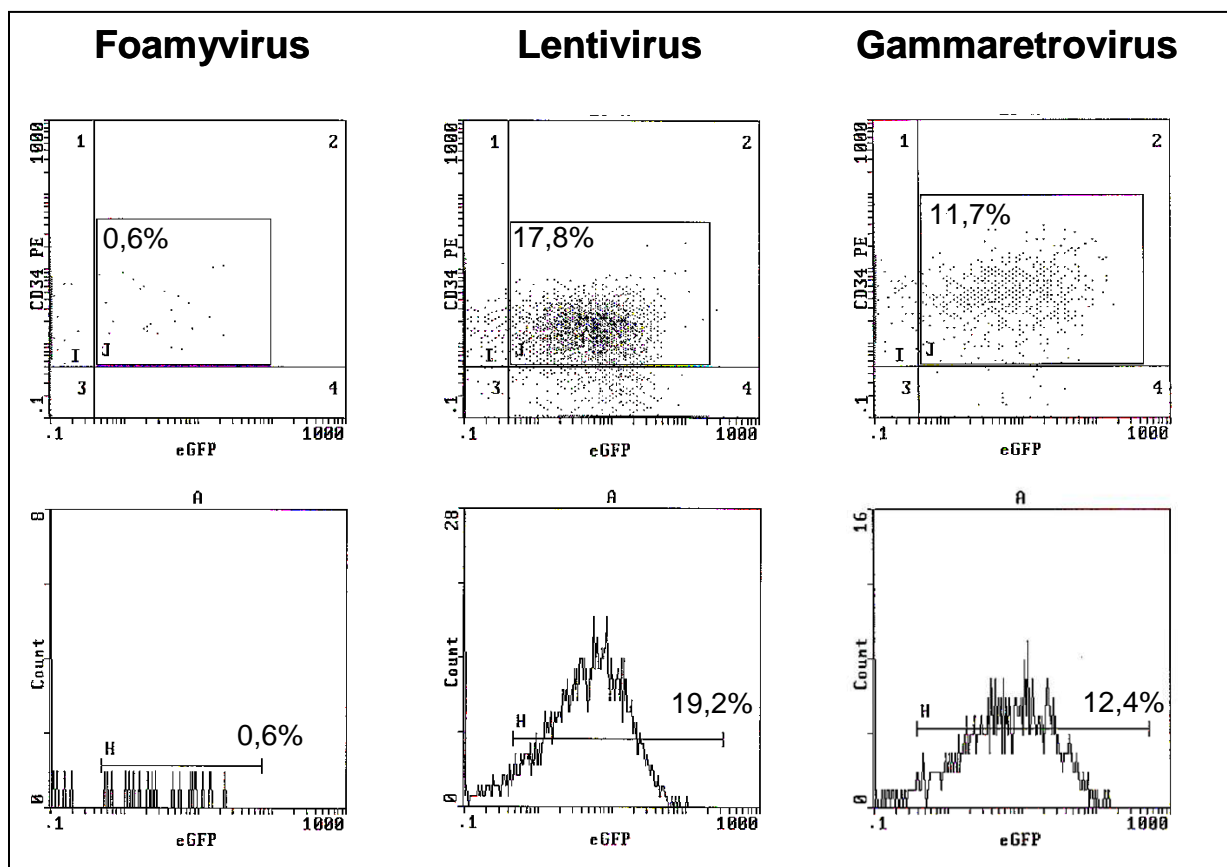
**Abbildung 3-9: Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse von transduzierten primären hämatopoetischen Vorläuferzellen.**

Die Daten stammen von einer Transduktion, die mit gammaretroviralen Überständen unter Verwendung des Protokolls 2 durchgeführt wurde. Bei der durchflusszytometrischen Auswertung des Versuchs wird mit Hilfe von PerCP- und PE-gekoppelten Antikörpern der Anteil an CD45<sup>+</sup>- (A) und CD34<sup>+</sup>-Zellen (B) bestimmt. In C ist der Anteil an *EGFP*-exprimierenden CD45<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>-Zellen in Form eines Plots und in D nochmals als Diagramm zu sehen.

Fraktion wurde dann über die *EGFP*-Markergenexpression der Anteil an transduzierten Zellen bestimmt.

Bei den Transduktionen der CD34<sup>+</sup>-Zellen kamen im Fall des foamyviralen und des lentiviralen Vektorsystems Überstände zum Einsatz, die mit dem Vierplasmidsystem hergestellt worden waren. Insgesamt bestätigten diese Gentransferversuche das Bild, das bereits durch die Transduktionen der Zelllinien von den verschiedenen Vektorsystemen gewonnen wurde. So wurden mit dem foamyviralen System generell nur sehr niedrige Transduktionsraten von unter einem Prozent erreicht. Bei Gentransferversuchen mit den lentiviralen Überständen lag der Anteil an transduzierten Zellen sowohl im Fall des Protokolls 2 als auch im Fall des Protokolls

3 durchschnittlich bei über 15%. Auch mit dem gammaretroviralen Vektorsystem wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Dabei zeigte sich, dass beim Protokoll 2 die lentiviralen Überstände von allen drei Vektorsystemen die höchsten Transduktionsraten erreichten, während im Fall des Protokolls 3 mit dem gammaretroviralen System die besten Resultate erzielt wurden. Die Abbildung 3-10 zeigt beispielhaft Transduktionsergebnisse, die mit den drei Vektorsystemen unter Verwendung des Protokolls 2 generiert wurden.



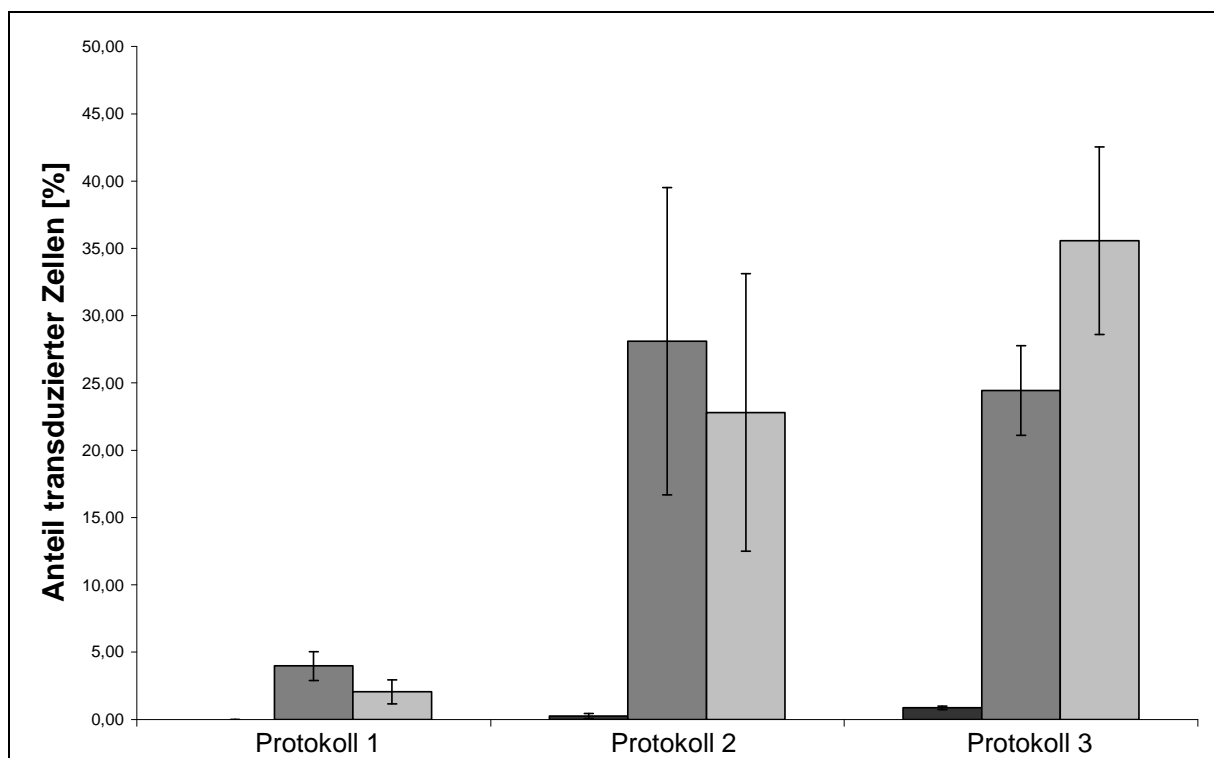
**Abbildung 3-10: Vergleich von Gentransferraten nach einer Transduktion von CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mit verschiedenen retroviralen Vektorsystemen.**

Die Abbildung zeigt exemplarisch Transduktionsergebnisse, die aus der Verwendung des Protokolls 2 resultierten. Hierbei wurden mit dem foamyviralen Vektorsystem nur Gentransferraten von unter 1% erreicht. Deutlich bessere Ergebnisse konnten mit den gammaretroviralen und lentiviralen Überständen erzielt werden. Dabei erwies sich im Fall des Protokolls 2 das lentivirale System als etwas effizienter.

In Abbildung 3-11 sind die Ergebnisse der verschiedenen Gentransferversuche zusammenfassend dargestellt. Dabei wurde jedes der drei Transduktionsprotokolle mit jedem viralen Vektorsystem jeweils dreimal getestet. In allen drei getesteten Protokollen schnitt das foamyvirale Vektorsystem signifikant schlechter ab als die lentiviralen (Protokoll 1:  $p = 0,037$ ; Protokoll 2:  $p = 0,05$ ; Protokoll 3:  $p = 0,05$ ) oder die gammaretroviralen Gentransfervektoren (Protokoll 1:  $p = 0,037$ ; Protokoll 2:  $p =$

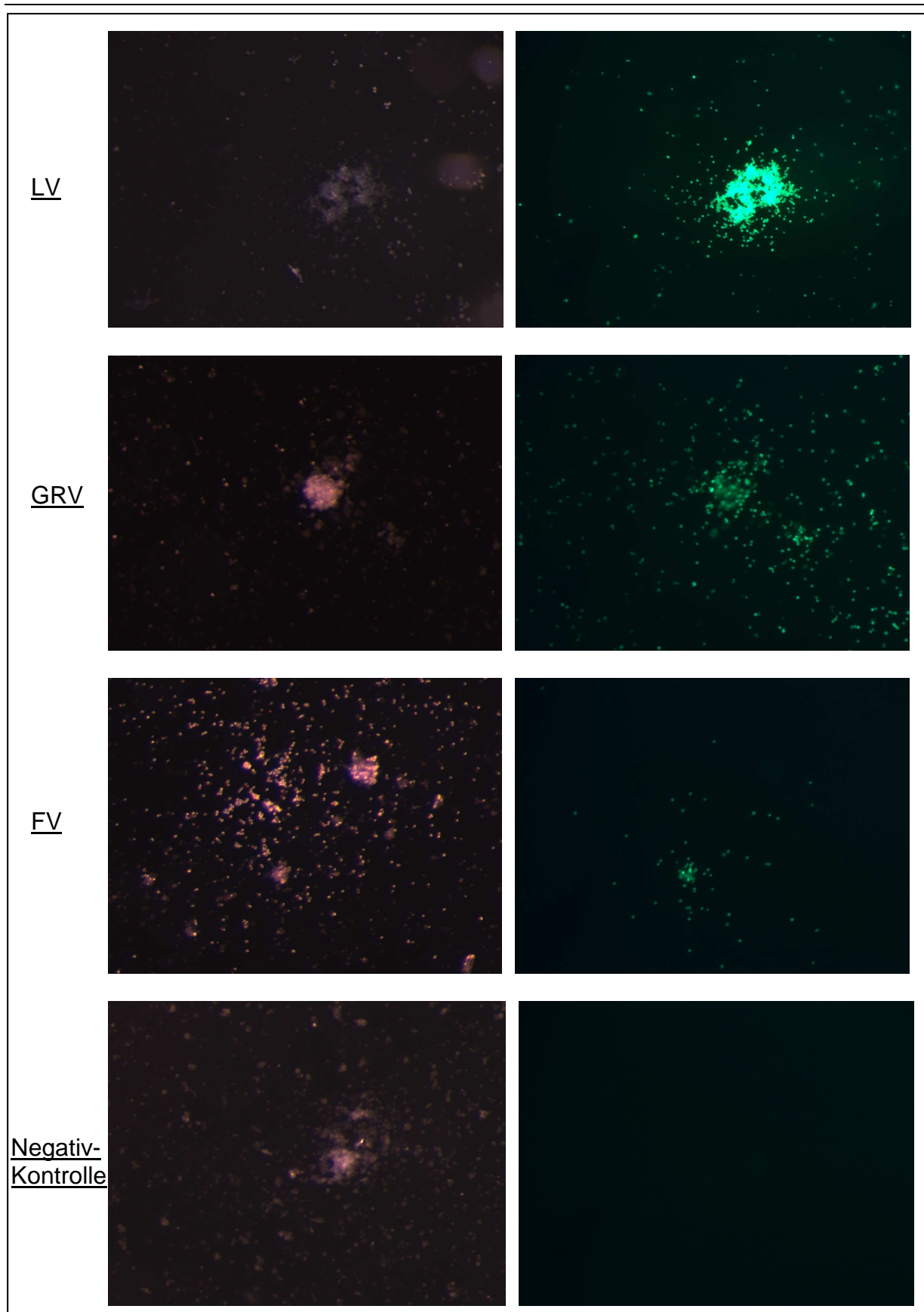


0,05; Protokoll 3:  $p = 0,05$ ). Während mit dem Protokoll 1 kein Gentransfer möglich war, lag der Anteil an transduzierten Zellen im Fall des Protokolls 2 bei  $0,24 \pm 0,20\%$ . Unter Verwendung des Protokolls 3 wurde eine durchschnittliche Transduktionseffizienz von  $0,86 \pm 0,14\%$  erreicht, die zumindest im Vergleich zu Protokoll 1 eine signifikante Verbesserung darstellte ( $p = 0,037$ ). Wie schon bei den Transduktionsversuchen mit den hämatopoetischen Zelllinien lagen auch hier das lenti- und das gammaretrovirale Vektorsystem hinsichtlich der erzielten Gentransferraten nahezu immer auf gleicher Höhe. So wurde unter Verwendung des Protokolls 1 mit lentiviralen Überständen eine Gentransfereffizienz von  $3,96 \pm 1,08\%$  und mit gammaretroviralen Präparationen eine mittlere Transduktionsrate von  $2,05 \pm 0,90\%$  erzielt. Bei dem Protokoll 2 lag der Anteil an transduzierten Zellen im Fall des lentiviralen Vektorsystems bei  $28,1 \pm 11,41\%$  und durch den Einsatz von gammaretroviralen Überständen bei  $22,8 \pm 10,32\%$ . Somit konnte mit beiden viralen



**Abbildung 3-11: Zusammenfassung der Gentransferraten in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Transduktion mit verschiedenen retroviralen Vektorsystemen.**

Dargestellt werden die mit den verschiedenen Vektorsystemen erreichten Transduktionsraten als Mittelwert  $\pm$  SEM. Jeder Mittelwert wurde aus jeweils drei Einzelversuchen berechnet. Jede Gruppe von Balken fasst die Ergebnisse eines der drei getesteten Transduktionsprotokolle zusammen. Der linke Balken einer jeden Gruppe steht dabei für das foamyvirale, der mittlere Balken für das lentivirale, und der rechte Balken für das gammaretrovirale Vektorsystem. Aus Gründen der Übersicht wird auf eine Darstellung der p-Werte in der Abbildung verzichtet. Sie werden jedoch an entsprechender Stelle im Text erwähnt.



**Abbildung 3-12: *EGFP*-exprimierende Kolonien im CFU-Assay.**

Die Abbildung zeigt beispielhaft *EGFP*-exprimierende Kolonien. Sie gingen aus primären hämatopoetischen Vorläuferzellen hervor, die entweder mit lentiviralen (LV), foamyviralen (FV) oder gammaretroviralen (GRV) Überständen transduziert worden waren.

Vektorsystemen eine signifikante Steigerung der Transduktionsraten im Vergleich zu Protokoll 1 erreicht werden (lentivirales Vektorsystem:  $p = 0,05$ ; gammaretrovirales Vektorsystem:  $p = 0,05$ ). Unter Verwendung des Protokolls 3 wurde ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Gentransferraten im Vergleich zu Protokoll 1 erzielt (lentivirales Vektorsystem:  $p = 0,05$ ; gammaretrovirales Vektorsystem:  $p = 0,05$ ). Interessanterweise erreicht bei diesem Protokoll das gammaretrovirale Vektorsystem mit einer durchschnittlichen Gentransfereffizienz von  $35,57 \pm 6,97\%$  bessere Ergebnisse als das lentivirale Gentransfersystem, dessen mittlere Transduktionsrate bei  $24,43 \pm 3,34\%$  lag.

Neben den FACS-Analysen wurden auch exemplarisch transduzierte oder untransduzierte CD34<sup>+</sup>-Zellen in einem CFU-Assay eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.13). Dabei werden die Zellen in semisolidem Medium, das mit den Wachstumsfaktoren IL-3, IL-6, SCF, EPO und G-CSF supplementiert worden war, ausgesät. Wie die Abbildung 3-12 gezeigt, konnten nach einer Inkubationsdauer von 10 bis 14 Tagen *EGFP*-exprimierende Kolonien identifiziert werden. Eine Differenzierung nach verschiedenen Zelllinien wurde dabei allerdings nicht vorgenommen. Somit konnte auch auf mikroskopischer Ebene die funktionelle Expression des Transgens in den transduzierten Zellen nachgewiesen werden. In einem solchen CFU-Assay sterben ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen innerhalb weniger Tage ab und die Kolonien, die zu sehen sind, werden von der klonogenen Nachkommenschaft der ausgesäten Vorläuferzellen gebildet. Daher ist das Vorhandensein der *EGFP*-exprimierenden Zellen letztendlich auch ein Beleg dafür, dass die mit den verschiedenen Vektorsystemen transduzierten CD34<sup>+</sup>-Zellen in der Lage waren, *In-vitro* zu proliferieren und zu differenzieren und dass das eingebrachte Transgen an die Nachkommenschaft weitergegeben wurde, da es stabil in das Wirtsgenom der Vorläuferzellen integriert worden war.

### **3.4 Transduktion primärer maligner hämatopoetischer Stammzellen**

Bei der Behandlung von Erkrankungen des blutbildenden Systems gewinnt der retrovirale Gentransfer zunehmend an Bedeutung. So liefert beispielsweise der Einsatz von retroviral modifizierten Zellen in Markierungsstudien einen Beitrag zum

Verständnis der Biologie solcher Neoplasien. Zudem stellt die genetische Modifikation von malignen Zellen ein potentielles Werkzeug bei der Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

**Tabelle 3-2: Informationen zu dem verwendeten Probenmaterial.**

Patient	Diagnose	Zytogenetik	Probenmaterial
1	AML M2	Keine Chromosomenanomalien	1 x PB
2	AML M4	Translokation t(8;21)	1 x KM
3	AML M1 / M2	46, XY [9] / 45, -8 [1] FLT-3-Längenmutation	1 x PB
4	MDS, CMML	Keine Chromosomenanomalien	1 x PB
5	AML M4	Keine Chromosomenanomalien	1 x KM
6	Aus einer CMML entstandene sekundäre AML	Keine Chromosomenanomalien	1 x PB
7	AML M2	Keine Chromosomenanomalien	1 x KM 2 x PB
8	MDS, RAEB II	5q-Deletion	1 x KM
9	AML M4	47XY, inv (16), Trisomie 22	1 x KM
10	MDS, RAEB II, Übergang in eine sekundäre AML	43 – 45, XX, del (1) (p31); del (5) (q13q33), add (11) (q25), + del (11) (q23), -12, -16, -17, -18 add (19) (p13), -20, -22, +1 – 5 mar, inc [cp26]	1 x KM
11	AML M0	Trisomie 11	1 x PB
12	AML M3	Keine Chromosomenanomalien	1 x PB

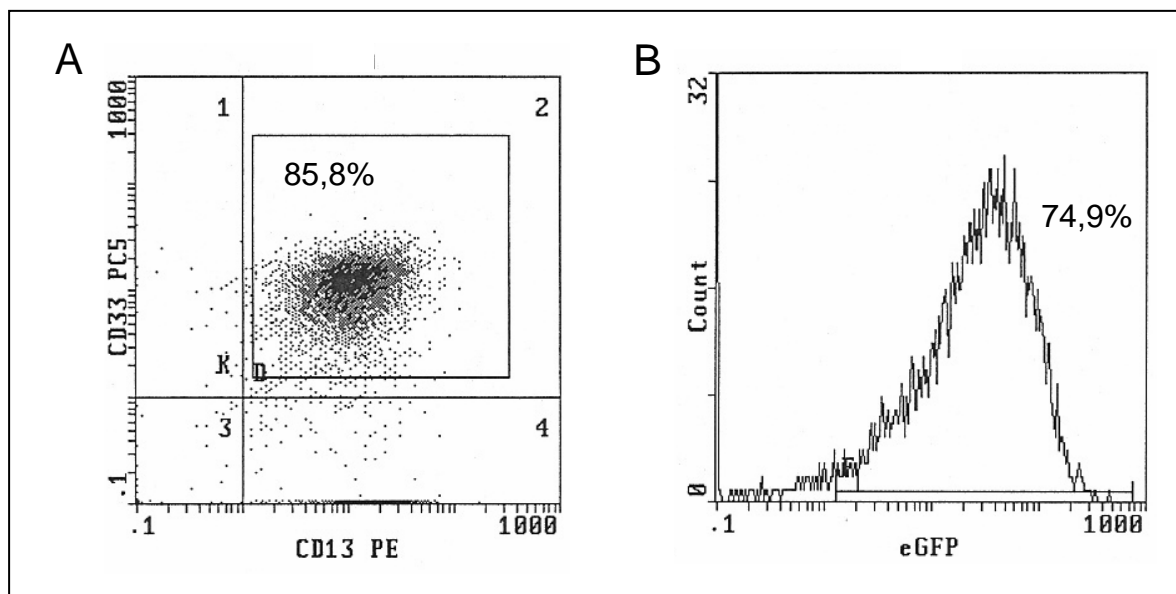
Abkürzungen: AML: Akute myeloische Leukämie; CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; KM: Knochenmark; MDS: Myelodysplasie; PB: peripheres Blut; RAEB: Refraktäre Anämie mit Überschuß von Blasten (excess of blasts); M0 – M5: AML-Subtypen gemäß der französisch-amerikanisch-britischen (FAB) Klassifikation [Parisi et al., 2002].

Sowohl die akute myeloische Leukämie (AML) als auch das Myelodysplastische Syndrom (MDS) sind die Folge einer gestörten Reifung von Vorstufen der blutbildenden Zellen im Knochenmark. Als Folge kommt es dabei häufig zu einem raschen Mangel an reifen Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, der mit einer oft drastischen Zunahme der unreifen Leukozyten einhergeht. Primäre Leukämiezellen sind relativ schwer zu transduzieren, da sie *In-vitro* häufig nur eine geringe Proliferation aufweisen. Aus diesem Grund bieten sich für Gentransferversuche besonders lentivirale Vektoren an, die prinzipiell in der Lage sind, auch nicht-proliferierende Zellen zu infizieren. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde daher die Transduktion akuter Leukämiezellen unter Verwendung des gammaretroviralen Vektorsystems mit dem lentiviralen Gentransfer in solche Zellen verglichen. Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Transduktionsraten in den vorangegangenen Versuchen wurde auf die Verwendung der foamyviralen Vektoren verzichtet.

### **3.4.1 Transduktion von Blasten der akuten myeloischen Leukämie und des myelodysplastischen Syndroms**

Da sowohl die AML als auch das MDS durch eine gestörte Ausreifung der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen und Myelodysplasien in sekundäre akute myeloische Leukämien übergehen können, wurden die Versuche mit den myeloischen Blasten dieser beiden Krankheitsformen für die folgenden Daten zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet. Die Tabelle 3-2 faßt die wichtigsten begleitenden Informationen über das verwendete Probenmaterial zusammen. Insgesamt wurden Proben von zwölf Patienten untersucht. Darunter befanden sich drei Myelodysplasien, nämlich eine chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML) und zwei refraktäre Anämien mit einem Überschuß von Blasten (RAEB II; Blastenanteil im Knochenmark: 11 – 20%). Bei einer RAEB wurde zudem ein Übergang in eine sekundäre AML diagnostiziert. Darüber hinaus gehörte zu dem Patientenmaterial eine sekundäre AML, die aus einer CMML hervorgegangen war. In allen anderen Fällen handelte es sich um primäre akute myeloische Leukämien mit den Subtypen M0, M1, M2, M3 oder M4. In sechs von zwölf Fällen konnten durch zytogenetische Untersuchungen keine Chromosomenanomalien festgestellt werden.

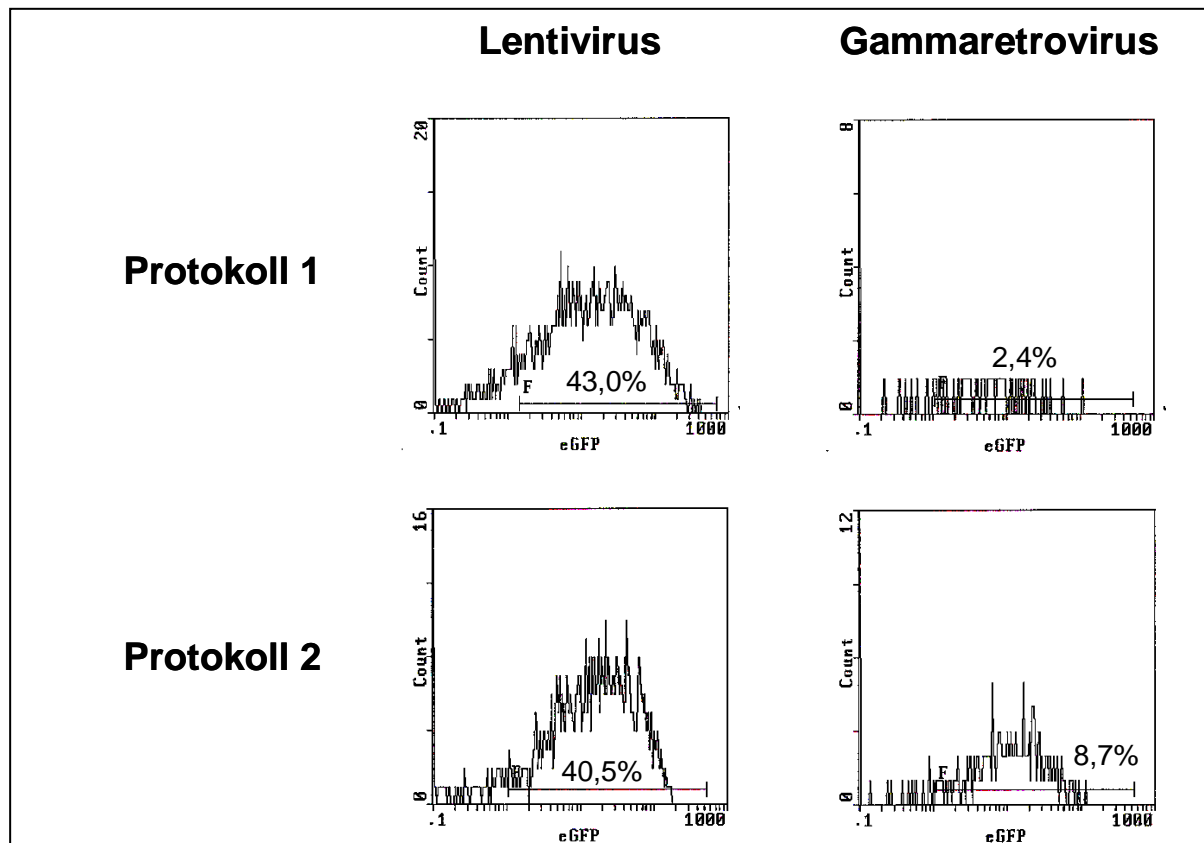
Bei der anderen Hälfte wurden dagegen genetische Veränderungen gefunden. Diese reichten von Deletionen, Translokationen und Längenmutationen über Trisomien einzelner Chromosomen bis hin zu komplexen Karyotypen. Da von einem Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten dreimal Zellmaterial zur Verfügung stand, wurden insgesamt 14 Proben für die Transduktionsversuche verwendet. In sechs Fällen handelte es sich um Knochenmarkpunktate und bei den restlichen acht Proben um peripheres Blut.



**Abbildung 3-13: Beispielfhaftes Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse transduzierter AML-Zellen.**

Die Daten stammen von einer Transduktion, die mit lentiviralen Überständen unter Verwendung des Protokolls 2 durchgeführt wurde. Bei der durchflusszytometrischen Auswertung des Versuchs wird mit Hilfe geeigneter Antikörper, hier mit Spezifität für CD13 (PE-markiert) und CD33 (PC5-markiert), die Population der leukämischen Zellen identifiziert (A). Innerhalb dieser Population wurde dann der Anteil an transduzierten Zellen anhand der *EGFP*-Expression bestimmt (B).

Für die Gentransferversuche wurden das Protokoll 1 und das Protokoll 2 verwendet. Bei den Transduktionen kamen neben den gammaretroviralen Überständen auch das lentivirale Zwei- und Vierplasmidsystem zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen wie bei den primären Vorläuferzellen. Als Wachstumsfaktoren wurden während der Prästimulation und der Transduktion SCF (100 ng/ml), G-CSF ( $1 \times 10^3$  U/ml) und Flt-3 (100 ng/ml) verwendet. Etwa 24 h nach Abschluß der Transduktion wurden die Zellen geerntet und die Höhe der *EGFP*-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Zur Identifikation der AML-Zellen wurden, je nach Klassifizierung der Leukämie, die myelomonozytären Marker CD13 und CD33, sowie der Stammzellmarker CD34 verwendet (siehe Abbildung 3-13).



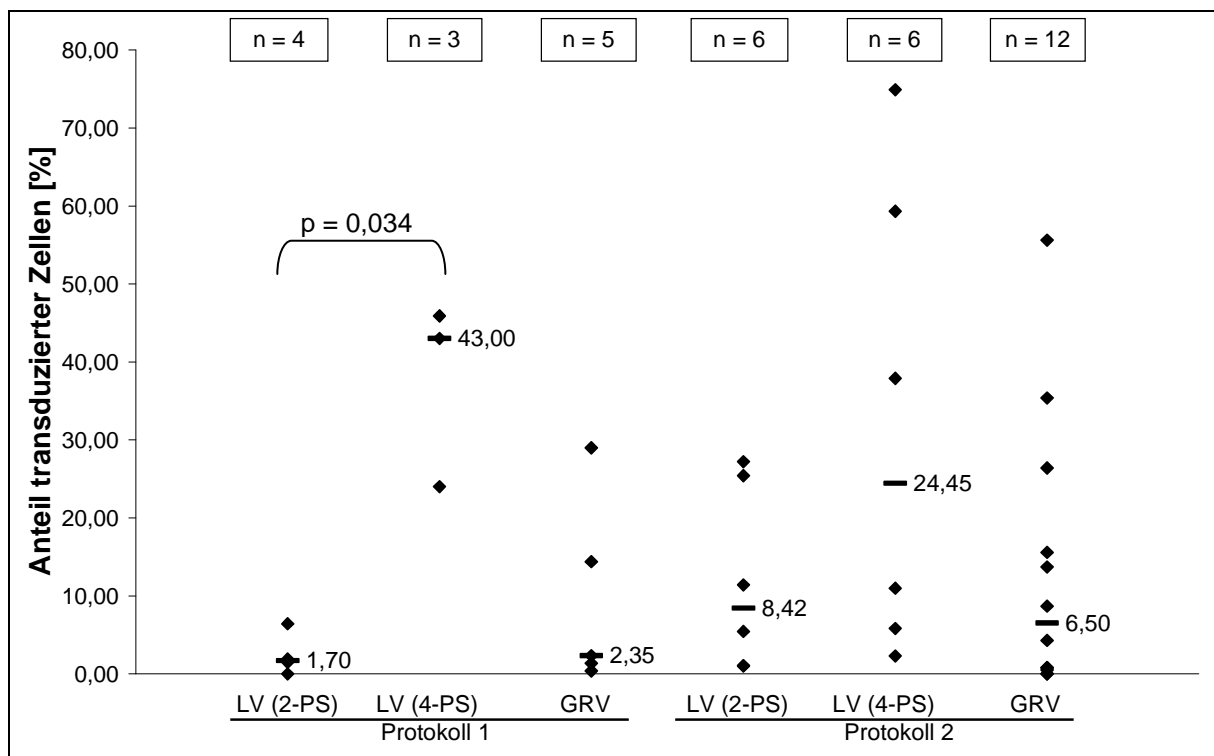
**Abbildung 3-14: Vergleichende Analyse von AML-Zellen nach Transduktion mit lentiviralen und gammaretroviralen Vektorsystemen.**

Die Abbildung zeigt exemplarisch *EGFP*-Expressionsdaten, die aus der Verwendung des Protokolls 1 und des Protokolls 2 zur Transduktion von AML-Zellen resultierten. Dabei wurden mit den Überständen des lentiviralen Vierplasmidsystems in der Regel höhere Gentransferraten erreicht als mit den gammaretroviralen Vektoren.

Allgemein zeigte sich bei den Versuchen, dass das lentivirale Vierplasmidsystem dem gammaretroviralen Vektorsystem und dem lentiviralen Zweiplasmidsystem überlegen war. Sowohl unter Verwendung des Protokolls 1, als auch bei Einsatz des Protokolls 2 konnten mit dessen Überständen im Durchschnitt die höheren Transduktionsraten erzielt werden. Im Vergleich der beiden Protokolle wurden mit dem längeren Protokoll 2 generell die besseren Ergebnisse erreicht. Die Abbildung 3-14 zeigt beispielhaft Transduktionsergebnisse, die unter Verwendung beider Protokolle generiert wurden und welche diesen Sachverhalt illustrieren.

In der Abbildung 3-15 werden die Ergebnisse dieser Gentransferversuche vergleichend gegenüber gestellt. Bei den ersten Experimenten wurden lentivirale Überstände verwendet, die mit dem Zweiplasmidsystem hergestellt worden waren. Insgesamt wurden vier Transduktionen nach dem Protokoll 1 unter Verwendung dieser lentiviralen Überstände durchgeführt. Die erzielten Transduktionsraten lagen dabei zwischen 0% und 7%, woraus sich ein Median von 1,7% ergab. Dieser lag im

Fall der gammaretroviralen Überstände mit 2,35% nur geringfügig höher. Dies ist wohl auf den Umstand zurückzuführen, dass bei zwei der fünf Transduktionen der Anteil an *EGFP*-exprimierenden Zellen über 10%, nämlich bei 14,4% und 29%, lag. Bei dem Protokoll 2 lag der Median *EGFP*-positiver Zellen für die Versuche mit den lentiviralen Überständen bei 8,42%. Während hier in vier von sechs Fällen die Transduktionsraten zwischen 1% und 12% lagen, gab es zwei Versuche, bei denen der Anteil an transduzierten Zellen mit 25,4% und 27,2% deutlich höher lag. Es wurden insgesamt 12 Transduktionen mit gammaretroviralen Überständen unter Verwendung des Protokolls 2 durchgeführt. Die einzelnen Gentransferraten wiesen dabei eine große Streuung auf. In sieben Fällen lag der Anteil an transduzierten Zellen zwischen 0% und 10%. Bei zwei Versuchen lag er zwischen 10% und 20% und dreimal wurden noch höhere Gentransferraten erzielt (einmal 26,4%, einmal 35,4% und einmal 55,6%). Aus diesen einzelnen Daten ergab sich ein Median des prozentualen Anteils transduzierter Zellen von 6,5%.

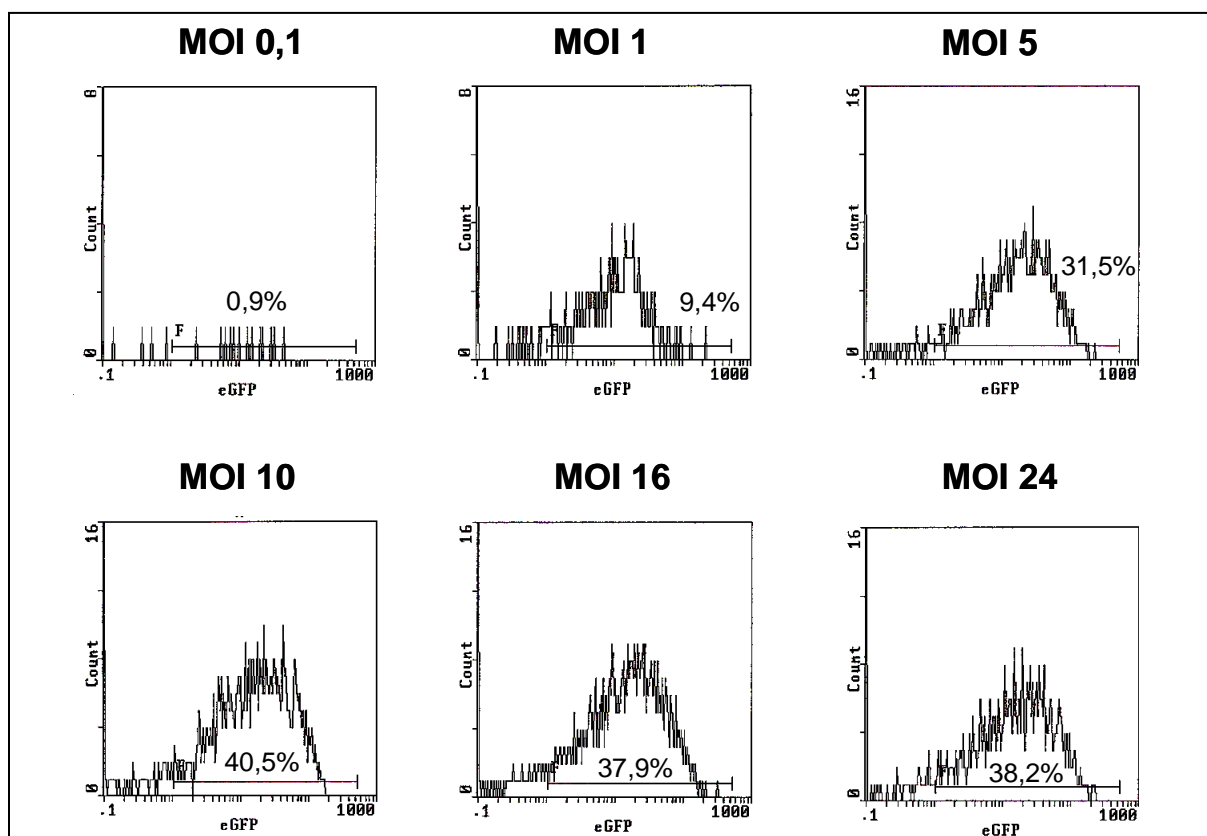


**Abbildung 3-15: Ergebnisse der Transduktionen primärer AML-Zellen mit lentiviralen und gammaretroviralen Überständen.**

In der Grafik werden die Ergebnisse aller Einzelversuche, bestimmt als prozentualer Anteil *EGFP*-exprimierender Zellen, als schwarze Punkte dargestellt. Der Balken und die danebenstehende Zahl geben den aus den Einzelversuchen ermittelten Median an. Abkürzungen: LV (2-PS): lentivirales Zweiplasmidsystem; LV (4-PS): lentivirales Vierplasmidsystem; GRV: gammaretrovirales Vektorsystem.



Während zu Beginn dieser Versuchsreihe die mit den beiden retroviralen Vektorsystemen erzielten Transduktionsraten im Median auf etwa der gleichen Höhe lagen, änderte sich dies, als lentivirale Überstände verwendet wurden, die mit dem Vierplasmidsystem hergestellt worden waren. Diese hatten, wie bereits in Kapitel 3.1.2 besprochen, höhere Titer als jene, die mit dem Zweiplasmidsystem hergestellt worden waren. Mit diesen lentiviralen Überständen wurden drei Transduktionsversuche unter Verwendung des Protokolls 1 durchgeführt. Die dabei erzielten Gentransferraten lagen bei 24%, 43% und 45,9%. Dies ergibt einen Median von 43%, der deutlich über den bereits erwähnten 2,35% liegt, die als Median mit den gammaretroviralen Überständen erzielt wurden und der signifikant höher war als der Median des lentiviralen Zweiplasmidsystems, welcher bei 1,7% lag ( $p = 0,034$ ). Auch bei der Verwendung des Protokolls 2 konnte eine deutliche Verbesserung durch den Einsatz der neuen lentiviralen Überstände erreicht werden. Die bei den sechs durchgeführten Versuchen erhaltenen Transduktionsraten streuten von 2,32%

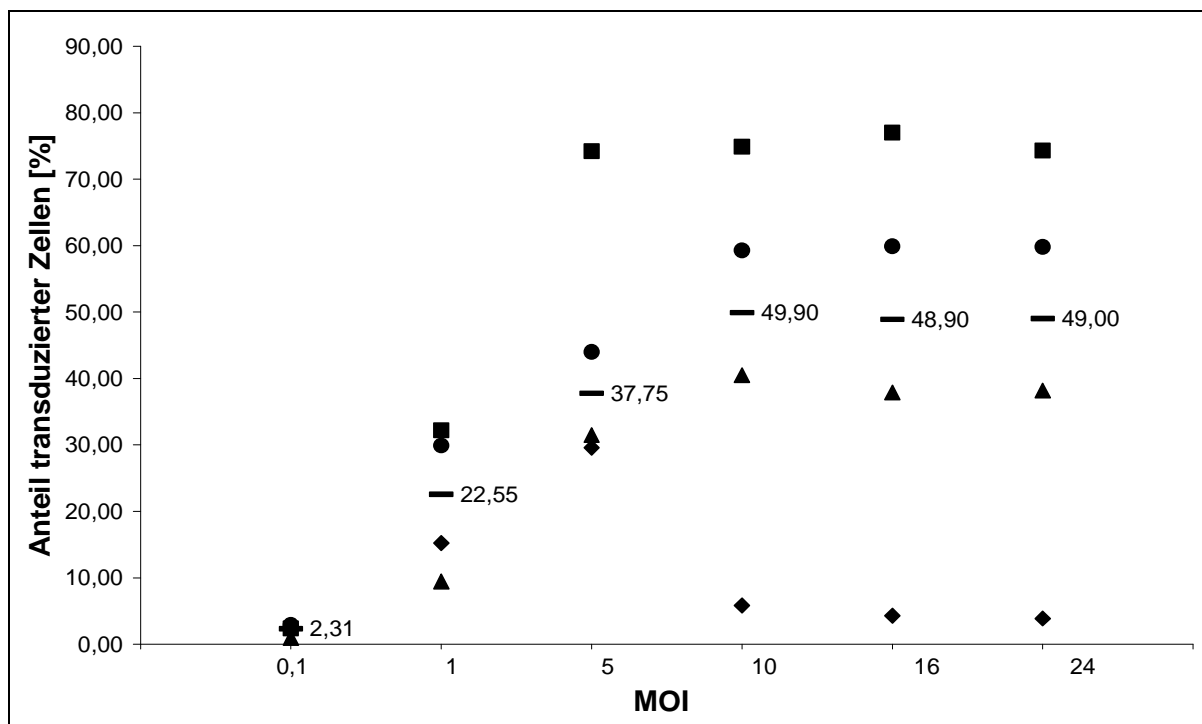


**Abbildung 3-16: Beispiel für den Einfluß der MOI auf die Gentransferraten in transduzierten AML-Zellen.**

In der Abbildung wird exemplarisch ein Einzelversuch zum Einfluß der MOI auf die Gentransferraten in transduzierten AML-Zellen dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnten die Gentransferraten in diesem Experiment zunächst mit zunehmender MOI erhöht werden. Bei einer MOI von 10 wurde eine Plateau-Phase erreicht, ab der keine weitere Verbesserung der Transduktionsrate erzielt wurde.

bis 74,9%. Der Median EGFP-positiver Zellen lag in diesem Fall bei 24,45%. Somit erwies sich das Vierplasmidsystem als das effizientere der beiden lentiviralen Vektorsysteme. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, dass diese beiden Vektorsysteme an unterschiedlichen Proben getestet wurden. Einen direkten Vergleich, bei dem die beiden lentiviralen Systeme zur Transduktion von Zellen der gleichen AML-Probe verwendet wurden, wurde nicht angestellt.

Ein weiterer untersuchter Aspekt war in diesem Zusammenhang der Einfluß der MOI (multiplicity of infection) auf die erreichten Transduktionsraten. Zu diesem Zweck kam das Protokoll 2 unter Verwendung von lentiviralen Überständen, die mit dem Vierplasmidsystem hergestellt worden waren, zum Einsatz. Für die Transduktion wurden die Überstände so verdünnt, dass man das gewünschte Verhältnis von Virenpartikeln zu Zielzellen hatte. Getestet wurden MOIs von 0,1, 1, 5, 10, 16 und 24. Für jede MOI wurden vier Einzelversuche durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche wurden vier verschiedene AML-Proben verwendet, wobei mit jeder Probe jeweils einmal alle sechs MOIs getestet wurden. Aus den Ergebnissen dieser Einzelversuche wurde dann jeweils der Median bestimmt. Die Abbildung 3-16 zeigt die Ergebnisse eines Einzelversuchs, während die Abbildung 3-17 die Daten aller vier Versuche zusammenfasst. Wie zu sehen ist, nahm der Anteil an transduzierten



**Abbildung 3-17: Transduktionsergebnisse bei Einsatz verschiedener MOIs.**

In der Grafik werden alle Einzelversuche (jeweils vier für jede MOI) dargestellt. Der Balken und die danebenstehende Zahl geben den aus den Einzelversuchen berechneten Median an.

Zellen, ausgehend von einem Median von 2,31% bei einer MOI von 0,1, bis zu einer MOI von 10, wo er dann bei 49,9% liegt, stetig zu. Schließlich wurde bei den letzten beiden MOI eine Plateau-Phase erreicht, bei der keine weitere Verbesserung der Transduktionsraten erreicht werden konnte.

### 3.4.2 Transduktion von Blasten der akuten lymphatischen Leukämie

Die Zellen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) besitzen im Gegensatz zu AML-Blasten oft eine entfernte Ähnlichkeit mit Lymphozyten und Lymphoblasten der Lymphknoten und sind durch ein entsprechendes immunologisches Markermuster charakterisiert. Neben den Untersuchungen zur Transduktion von AML-Blasten wurden auch mit insgesamt drei ALL-Proben Transduktionsversuche unter Verwendung des lentiviralen Zwei- und Vierplasmidsystems, sowie des gammaretroviralen Vektorsystems durchgeführt. Hierzu wurden das Protokoll 1 und das Protokoll 2 verwendet. Hierbei fand die Transduktion der Zellen einerseits, wie bei den vorangegangenen Versuchen auch, auf Fibronektin statt. Darüber hinaus wurden ALL-Zellen im Rahmen beider Protokolle aber auch auf einem Monolayer von CD40L-L-Zellen transduziert (siehe Abschnitt 2.4.10.2). Diese Zellen exprimieren den Faktor CD40 Ligand (CD40-L), der die Proliferation und Aktivierung von B-Zellen induziert und in den hier vorliegenden Versuchen zur Stimulation der ALL-Zellen beitragen sollte. Bei der abschließenden durchflusszytometrischen Analyse der *EGFP*-Expression wurde auf den transduzierten Zellen mit Hilfe von PE- und PC5-gekoppelten Antikörpern nach den ALL-typischen Oberflächenmarkern CD10 und CD19 gesucht, um die Transduktion von ALL-Zellen nachzuweisen.

Die Tabelle 3-3 faßt die wichtigsten Informationen über die verwendeten ALL-Proben zusammen. So handelte es sich bei allen drei Proben um eine c-ALL. Diese Form der akuten Leukämie stellt einen Subtyp der sogenannten „B-Vorläufer-ALL“, also einer ALL mit B-lymphozytärer Differenzierung dar. Während in einem Fall keine Chromosomenanomalien festgestellt werden konnten, wurde in einem anderen Fall mittels PCR-Diagnostik ein Fusionstranskript im Sinne einer Chromosomentranslokation nachgewiesen. Bei der dritten c-ALL zeigte eine Giemsa-Färbung, dass 7 von insgesamt 30 Metaphasen einen nahezu triploiden Chromosomensatz besaßen. Bei dem für die Versuche verwendeten Probenmaterial handelte es sich zweimal um peripheres Blut und einmal um Knochenmark.

**Tabelle 3-3: Informationen zu den verwendeten B-ALL-Proben.**

Patient	Diagnose	Zytogenetik	Probenmaterial
1	c-ALL	Normaler Karyotyp; PCR-Analytik: E2A/PBX1-mRNA Fusionstranskript im Sinne einer Chromosomen- translokation t(1;19) (q23;p13); bcr-abl negativ	1 x PB
2	c-ALL	Normaler Karyotyp; bcr-abl negativ (PCR)	1 x PB
3	c-ALL	Giemsa-Färbung von 30 Metaphasen ergab: 23 Metaphasen besaßen einen normalen Karyotyp und 7 Metaphasen hatten einen nahezu triploiden Chromosomensatz: 65, XXY, add (1) (q?44) [inc].	1 x KM

Abkürzungen: c-ALL: (common) akute lymphatische Leukämie; KM: Knochenmark; PB: peripheres Blut.

Die Tabelle 3-4 faßt die Ergebnisse der einzelnen Transduktionsversuche zusammen. Bei den ersten beiden der drei ALL-Proben wurden lentivirale Überstände verwendet, die mit dem Zweiplasmidsystem hergestellt worden waren. Transduktionen fanden mit diesen Überständen unter Verwendung des Protokolls 1 zweimal auf Fibronectin statt und zweimal auf einem Monolayer von CD40L-L-Zellen. Nur in einem der zwei Versuche auf Fibronectin konnte eine geringe Gentransferrate von 0,31% nachgewiesen werden. Auch das Protokoll 2 wurde jeweils zweimal mit diesen Überständen auf Fibronectin und CD40L-L-Zellen getestet. Wiederum konnte nur in einem Gentransferversuch auf Fibronectin ein Anteil an transduzierten Zellen von nicht mehr als 0,34% ermittelt werden. Für die Transduktionsversuche mit der dritten ALL-Probe wurden lentivirale Überstände benutzt, die mit dem Vierplasmidsystem hergestellt worden waren. Hier wurde jeweils nur ein Versuch auf Fibronectin und CD40L-L-Zellen unter Verwendung des Protokolls 2 durchgeführt. Auf den „Feeder“-Zellen wurde dabei eine Gentransferrate von 1,6% erreicht, während auf Fibronectin der Anteil an transduzierten Zellen 10,9% betrug. Auch mit den gammaretroviralen Überständen wurden Transduktionsversuche durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll 1 zweimal auf Fibronectin und einmal auf CD40L-L-Zellen getestet. Nur bei einem Versuch auf Fibronectin wurde eine Transduktionsrate von 0,53% erreicht. Das Protokoll 2 wurde dreimal auf Fibronectin und zweimal auf

CD40L-L-Zellen durchgeführt. Hier konnte bei keinem der Versuche ein Gentransfer nachgewiesen werden. Zusammengefasst zeigte sich bei diesen Experimenten, dass die Versuche mit dem lentiviralen Zweiplasmidsystem und dem gammaretroviralen Vektorsystem insgesamt nicht erfolgreich waren. Ein nachweisbarer Gentransfer in ALL-Zellen war nur in seltenen Fällen möglich. Doch selbst dann lagen die erzielten Transduktionsraten nur bei etwa 1%. Dagegen betrug in dem einen Versuch, bei dem das lentivirale Vierplasmidsystem zum Einsatz kam, der Anteil an transduzierten ALL-Zellen ca. 11%. Zudem muss festgehalten werden, dass ein Gentransfer in ALL-Zellen nur auf Fibronectin möglich war. Die Transduktionsversuche auf dem CD40L-L-Monolayer waren generell erfolglos.

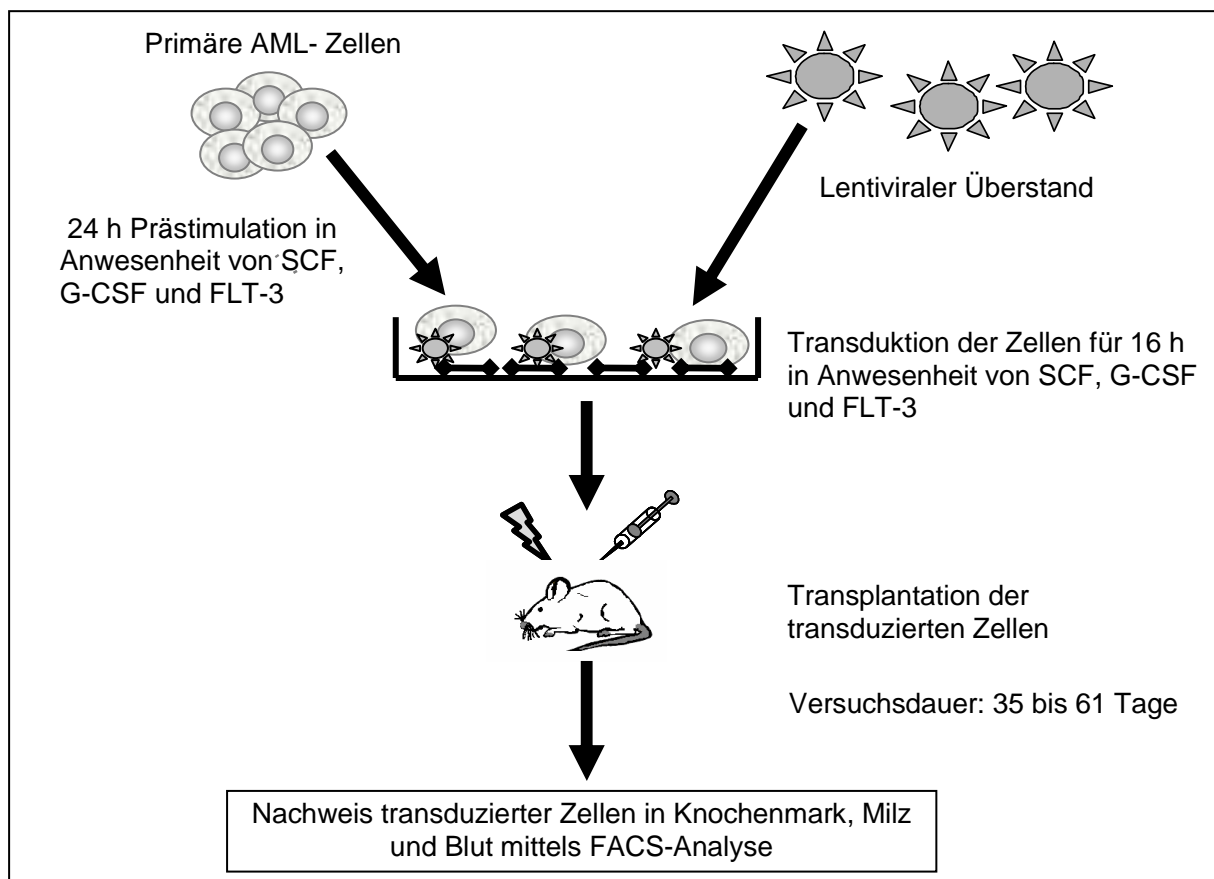
**Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gentransferversuche mit ALL-Zellen**

ALL-Probe	Protokoll	Vektorsystem	Transduktion auf	Transduktionsrate [%]
1	1	LV (2-PS)	Fibronectin	0,31
	1	LV (2-PS)	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	1	GRV	Fibronectin	0,53
	2	LV (2-PS)	Fibronectin	0,34
	2	LV (2-PS)	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	2	GRV	Fibronectin	n. m.
2	1	LV (2-PS)	Fibronectin	n. m.
	1	LV (2-PS)	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	1	GRV	Fibronectin	n. m.
	1	GRV	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	2	LV (2-PS)	Fibronectin	n. m.
	2	LV(2-PS)	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	2	GRV	Fibronectin	n. m.
	2	GRV	CD40L-L-Monolayer	n. m.
3	2	LV (4-PS)	Fibronectin	10,90
	2	LV (4-PS)	CD40L-L-Monolayer	n. m.
	2	GRV	Fibronectin	1,60
	2	GRV	CD40L-L-Monolayer	n. m.

Abkürzungen: LV (2-PS): lentivirales Zweiplasmidsystem; LV (4-PS): lentivirales Vierplasmidsystem; GRV: gammaretrovirales Vektorsystem; n. m.: nicht messbar.

### 3.5 *In-vivo*-Untersuchungen von transduzierten primären AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell

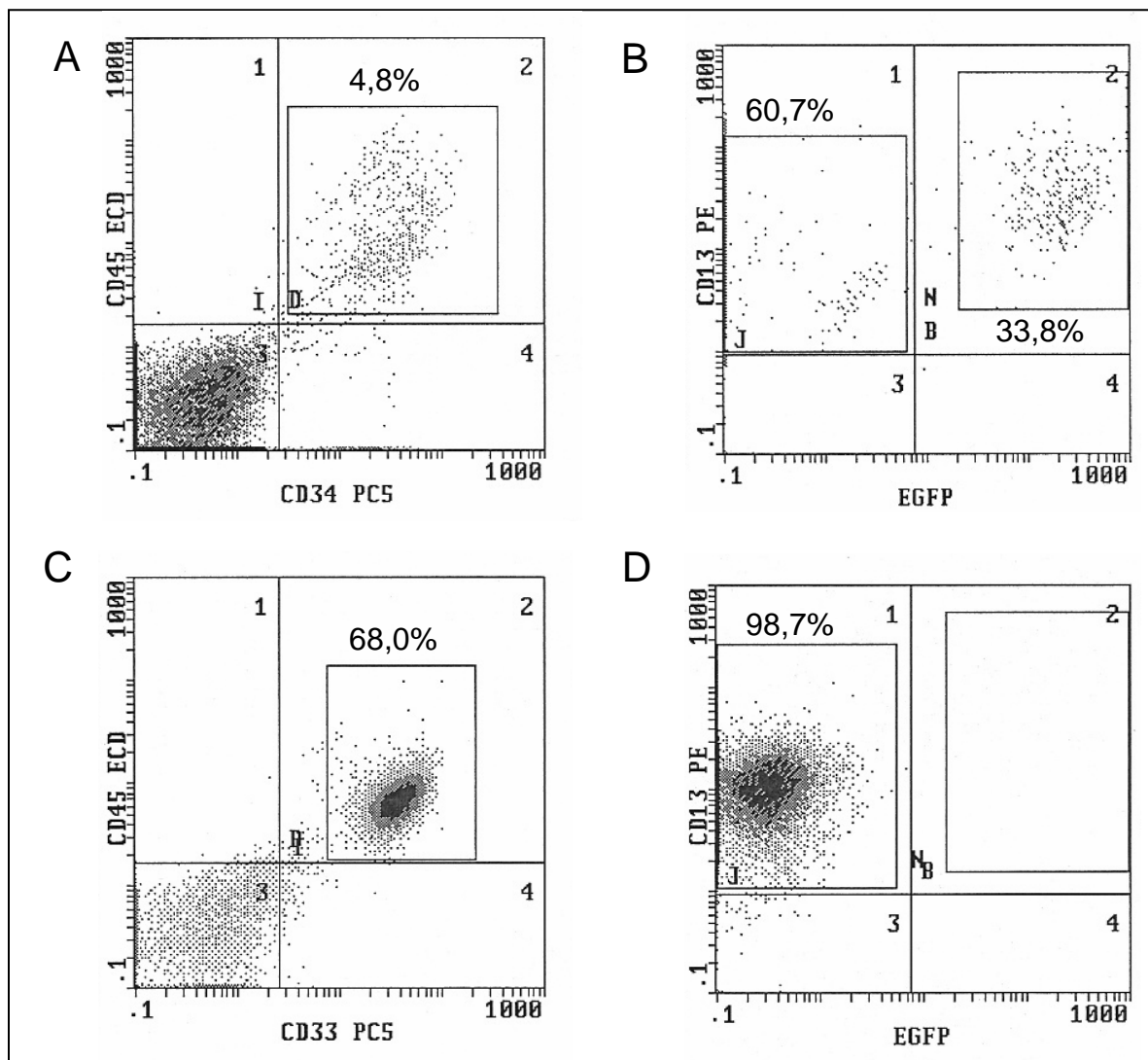
Nachdem sich primäre akute myeloische Leukämien *In-vitro* reproduzierbar mit Hilfe lentiviraler Überstände transduzieren ließen, wurden zwei Transplantationsversuche im NOD/LtSz-Prkdc<sup>scid</sup>/Prkdc<sup>scid</sup> (NOD/SCID) Mausmodell durchgeführt. Dabei sollte einerseits untersucht werden, ob und in welchem Umfang lentiviral transduzierte AML-Zellen in den Mäusen engraften, und zum anderen sollte das Anwachsen der transduzierten Zellen mit dem Engraftment-Verhalten von untransduzierten Zellen direkt verglichen werden. Die Abbildung 3-18 skizziert den Ablauf der Versuche. Im Rahmen dieser Experimente wurde das Protokoll 2 für die Transduktion der leukämischen Zellen verwendet. Die dabei eingesetzten MOIs lagen zwischen 8 und 10. Für die Transduktionen wurden die mit dem Vierplasmidsystem hergestellten



**Abbildung 3-18: Protokoll für die Transplantation transduzierter AML-Zellen in NOD/SCID-Mäuse.**

Prästimulierte primäre AML-Zellen wurden mit lentiviralen Überständen transduziert und anschließend in sublethal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Nach fünf bis neun Wochen wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und Knochenmark, Milz und peripheres Blut auf das Vorhandensein von AML-Zellen allgemein, speziell aber transduzierter, *EGFP*-exprimierender AML-Zellen durchflusszytometrisch durchsucht.

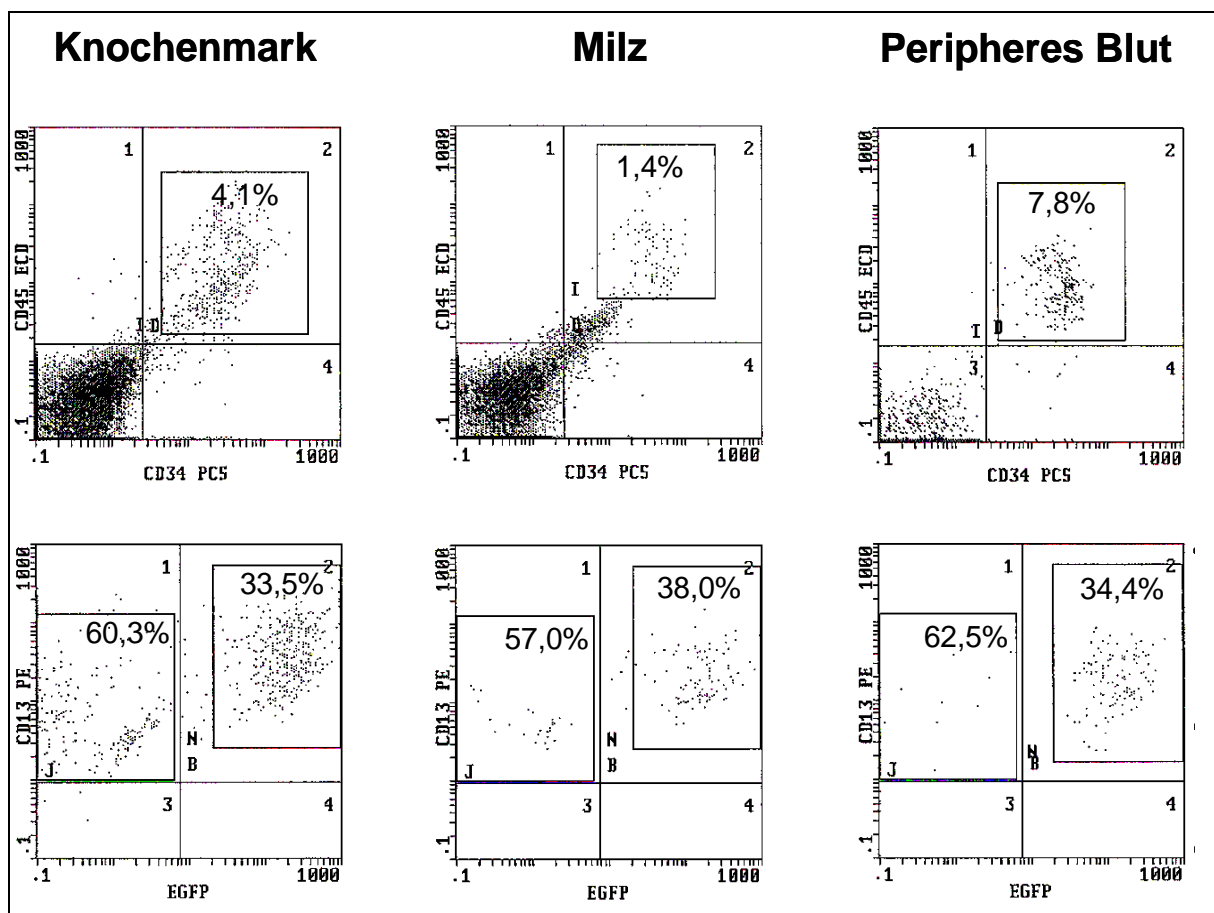
lentiviralen Überstände verwendet, die bereits in den *In-vitro*-Versuchen erfolgreich verwendet worden waren. Am Versuchsende wurden die aufgearbeiteten Blut-, Knochenmark- und Milzzellen mit CD45-, CD34-, CD33- und CD13-spezifischen, PE, ECD- und PC5-gekoppelten Antikörpern gefärbt und der Anteil an humanen AML-Zellen in den Organen insgesamt, sowie der Anteil *EGFP*-exprimierender Zellen im Besonderen durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die Abbildung 3-19 zeigt Beispiele für den durchflusszytometrischen Nachweis von transduzierten und untransduzierten AML-Zellen.



**Abbildung 3-19: Durchflusszytometrische Analyse von murinem Knochenmark nach Transplantation humaner AML-Zellen.**

Die Bilder (A) und (B) stammen von einer Maus aus Experiment 1, die nach 35 Tagen aus dem Versuch genommen worden war. Es konnten im Knochenmark 4,8% CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Population waren über 90% der Zellen CD13<sup>+</sup> und wiederum 33,8% von diesen zeigten eine *EGFP*-Expression. Die Bilder (C) und (D) stammen von einer der beiden Mäuse aus Experiment 2, denen untransduzierte Zellen appliziert worden waren und die nach 61 Tagen aus dem Versuch genommen worden waren. Hier zeigen die Zahlen (68% waren CD45<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>, davon waren nochmal 98,7% CD13<sup>+</sup>) eindrucksvoll ein hohes Engraftment der leukämischen Zellen.

Im ersten Versuch wurden zwei Mäusen jeweils  $1,16 \times 10^7$  Zellen einer AML mit dem Subtyp M2 transplantiert. Die initiale Transduktionsrate der Zellen lag bei 48,6%. Eine Maus wurde nach 35 Tagen aus dem Versuch genommen, die zweite Maus acht Tage später. In diesem Versuch war der Nachweis von AML-Zellen bei beiden Tieren möglich. Bei der ersten Maus, die nach 35 Tagen aus dem Versuch genommen worden war, lag der Anteil an AML-Zellen im Knochenmark bei 4,02%, von diesen zeigten 33,5% eine *EGFP*-Expression. In der Milz betrug der Anteil an AML-Zellen 1,36%, von denen 38% transduziert waren. Insgesamt konnten beim ersten Tier in zwei Coxa-, zwei Tibia- und zwei Femur-Knochen zusammen  $4,03 \times 10^5$  AML-Zellen und in der Milz  $1,04 \times 10^5$  AML-Zellen nachgewiesen werden. Im peripheren Blut lag der Anteil an Zellen mit dem gewünschten immunologischen Phänotyp sogar bei 7,58%. Von diesen Zellen waren 34,4% EGFP-positiv. Die



**Abbildung 3-20: Vergleichende Analyse des Engraftments von transduzierten AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell.**

Die Abbildung zeigt exemplarisch erhobene durchflusszytometrische Daten, die von der Maus stammen, die im ersten Experiment bereits nach 35 Tagen aus dem Versuch genommen worden war. Es konnten sowohl im Knochenmark, als auch in der Milz und dem peripheren Blut des Tieres humane Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil dieser Zellen schwankte dabei zwischen 1,4% und 7,8%. Innerhalb der Population der humanen Zellen lag der Anteil transduzierter Zellen zwischen 33,5% und 38,0%.



**Tabelle 3-5: Auswertung des ersten Transplantationsexperiments**

	Knochenmark		Milz		Peripheres Blut	
	AML-Zellen [%]	Anteil transduzierter AML-Zellen [%]	AML-Zellen [%]	Anteil transduzierter AML-Zellen [%]	AML-Zellen [%]	Anteil transduzierter AML-Zellen [%]
Maus 1	4,02	33,50	1,36	38,00	7,58	34,40
Maus 2	1,81	18,60	0,84	30,60	2,58	15,90

Abbildung 3-20 zeigt beispielhaft durchflusszytometrisch erhobene Daten, die diese Ergebnisse wiedergeben. Bei der zweiten Maus, die nach 43 Tagen aus dem Versuch genommen wurde, lagen die Werte etwas tiefer. So betrug im Knochenmark der Anteil an AML-Zellen 1,81%, und von diesen waren 18,6% transduziert. In der Milz fanden sich nur 0,84% AML-Zellen, von denen 30,6% EGFP-positiv waren. Letztendlich wurden bei der zweiten Maus in den entnommenen Knochen  $1,59 \times 10^5$  AML-Zellen und in der Milz  $4,32 \times 10^4$  AML-Zellen nachgewiesen. Im peripheren Blut lag der Anteil an AML-Zellen mit 2,58% wieder etwas höher. Von diesen zeigten

**Tabelle 3-6: Versuchsaufbau des zweiten Transplantationsversuchs**

	Tiere	Anzahl transplantierte Zellen	Initiale Gentransferrate [%]	Versuchsdauer [Tage]
Transplantation von transduzierten AML-Zellen	Maus 1	$1,60 \times 10^7$	64,00	45
	Maus 2	$1,60 \times 10^7$	64,00	45
	Maus 3	$1,60 \times 10^7$	64,00	61
	Maus 4	$5,48 \times 10^6$	64,00	61
Transplantation von untransduzierten AML-Zellen	Maus 5	$1,50 \times 10^7$	/	45
	Maus 6	$1,50 \times 10^7$	/	45
	Maus 7	$1,50 \times 10^7$	/	61
	Maus 8	$1,50 \times 10^7$	/	61

15,9% eine *EGFP*-Expression. Die Tabelle 3-5 faßt nochmal alle Resultate des ersten Transplantationsversuchs zusammen.

Der zweite Versuch umfaßte acht Mäuse. Für den Gentransfer wurden Zellen einer AML mit dem Subtyp M3 verwendet. Die initiale Transduktionsrate lag in diesem Fall bei 64%. Anschließend wurden drei Tieren  $1,6 \times 10^7$  und einer weiteren Maus  $5,48 \times 10^6$  transduzierte Zellen transplantiert. Darüber hinaus wurden in diesem Versuch vier Tieren zum Vergleich jeweils  $1,5 \times 10^7$  untransduzierte AML-Zellen transplantiert. Nach 45 und nach 61 Tagen wurden jeweils zwei Tiere, denen transduzierte Zellen appliziert worden waren, und zwei Tiere, die untransduzierte Zellen erhalten hatten, aus dem Versuch genommen. Die Tabelle 3-6 faßt die Bedingungen des zweiten Transplantationsversuchs zusammen. Von den vier Tieren, denen transduzierte Zellen transplantiert worden waren, konnten nur in den zwei Individuen, denen  $1,6 \times 10^7$  Zellen appliziert worden waren und die nach 45 Tagen aus dem Versuch genommen worden waren, Zellen mit dem gesuchten immunologischen Phänotyp nachgewiesen werden. Hier lag der Anteil an humanen AML-Zellen im Knochenmark der einen Maus bei 0,54%, im Fall der zweiten Maus betrug er 0,46%. Insgesamt konnten in den beiden Coxa-, den zwei Tibia- und einem Femur-Knochen der ersten Maus zusammen  $3,62 \times 10^4$  AML-Zellen und in denen des zweiten Tieres zusammen

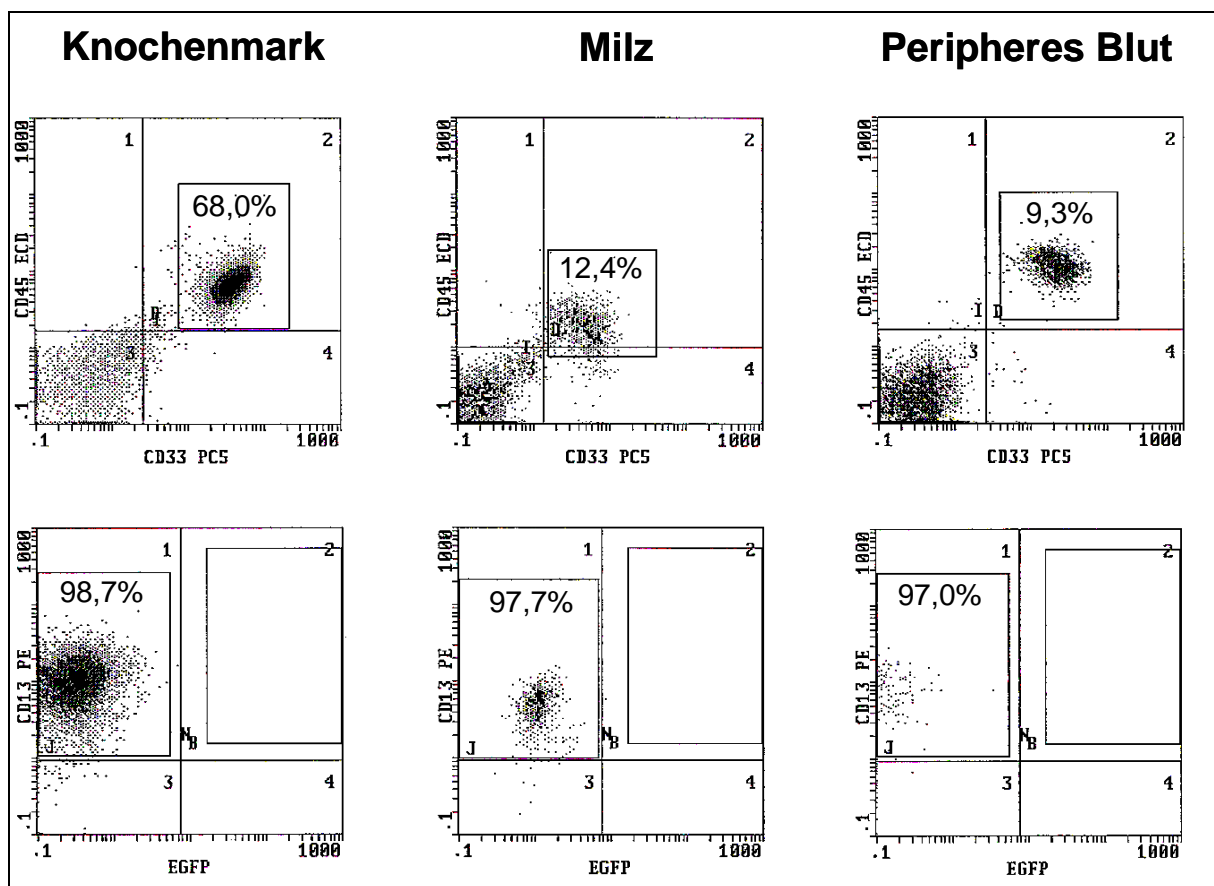
**Tabelle 3-7: Engraftment der untransduzierten AML-Zellen in den Kontrollmäusen**

	Knochenmark		Milz		Peripheres Blut	
	AML-Zellen [%]	AML-Zellzahl [Total]*	AML-Zellen [%]	AML-Zellzahl [Total]	AML-Zellen [%]	AML-Zellzahl [Total]
Maus 1	36,13	$1,95 \times 10^6$	0,35	$5,7 \times 10^3$	6,12	/
Maus 2	34,32	$2,64 \times 10^6$	0,27	$2,3 \times 10^3$	3,56	/
Maus 3	67,12	$7,72 \times 10^6$	12,11	$1,83 \times 10^6$	9,05	/
Maus 4	69,10	$6,91 \times 10^6$	10,28	$1,08 \times 10^6$	9,13	/

\* Es handelt sich um die isolierten und vereinigten Zellen zweier Coxa-, zweier Tibia- und einem Femur-Knochen.

$3,33 \times 10^4$  AML-Zellen nachgewiesen werden. Von diesen geringen Populationen zeigten bei der ersten Maus 41,1% und bei der zweiten Maus 42,4% eine *EGFP*-Expression. In der Milz und in dem peripheren Blut beider Mäuse waren jedoch keine humanen Zellen nachweisbar. Bei den beiden anderen Tieren, denen ebenfalls transduzierte Zellen appliziert worden waren, und die 16 Tage später aus dem Versuch genommen worden waren, konnten weder im Knochenmark, noch in Milz oder peripherem Blut humane Zellen gefunden werden.

Ganz anders sah es bei den Mäusen aus, denen untransduzierte Zellen transplantiert worden waren (siehe Tabelle 3-7). Hier lag bei den beiden Tieren, die nach 45 Tagen aus dem Versuch genommen worden waren, der Anteil an AML-Zellen im Knochenmark bei 36,1% und 34,3%, in der Milz bei 0,4% und 0,3% und im peripheren Blut bei 6,1% und 3,6%. Dabei konnten in den Knochen  $1,95 \times 10^6$  bzw.  $2,64 \times 10^6$  AML-Zellen und in den Milzen  $5,7 \times 10^3$  und  $2,3 \times 10^3$  AML-Zellen

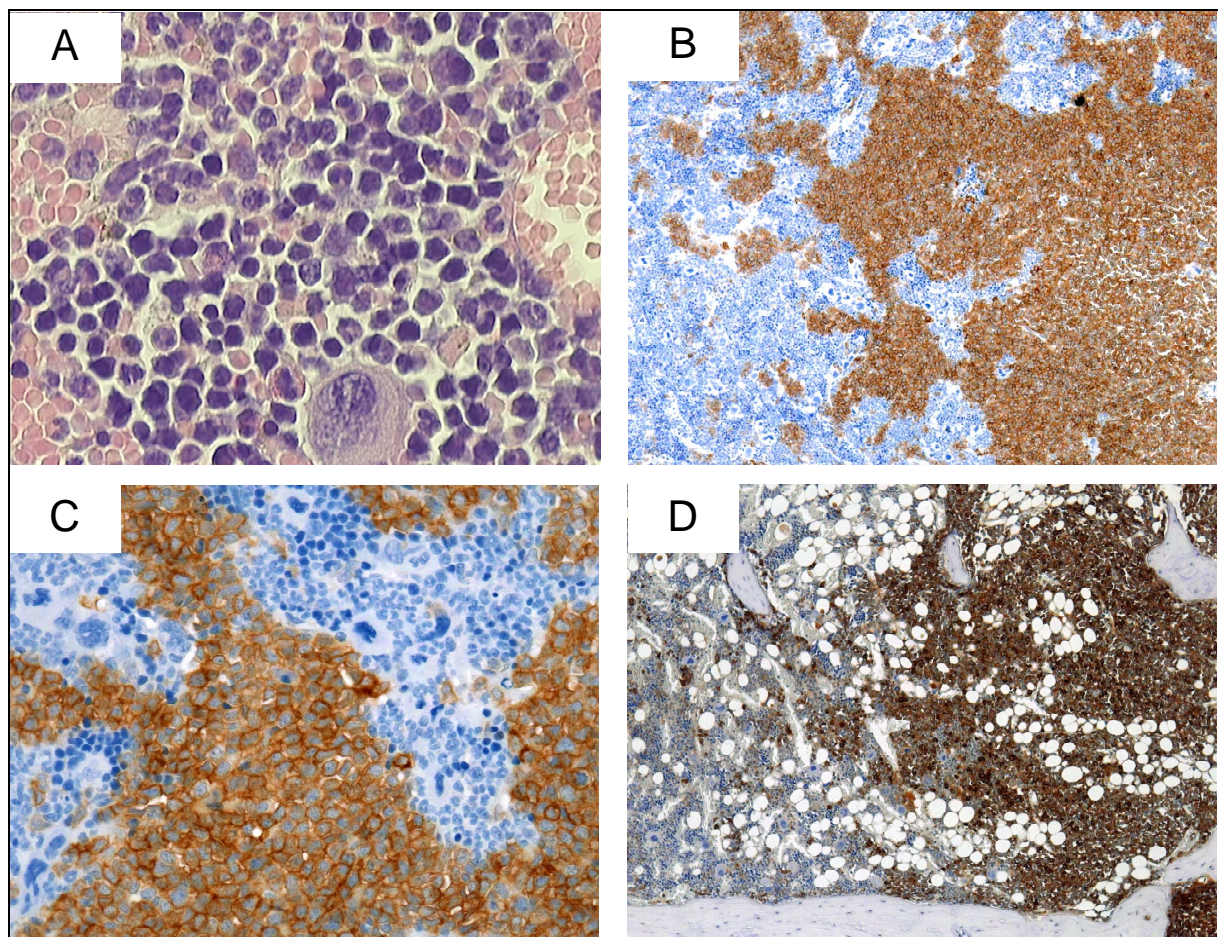


**Abbildung 3-21: Durchflusszytometrische Analyse des Engraftments untransduzierter AML-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell.**

Die Abbildung zeigt exemplarisch erhobene durchflusszytometrische Daten, die von einer Maus stammen, die im zweiten Experiment nach 61 Tagen aus dem Versuch genommen worden war. Wie zu sehen ist, war besonders im Knochenmark ein gutes Engraftment der leukämischen Zellen zu beobachten gewesen. In der Milz und dem peripheren Blut lag der Anteil an leukämischen Zellen mit 12,4% bzw. 9,3% deutlich niedriger.

nachgewiesen werden. In den beiden Mäusen, die etwa zwei Wochen länger im Versuch verblieben, zeigten die AML-Zellen ein noch höheres Engraftment. So lag ihr Anteil im murinen Knochenmark bei 67,1% und 69,1%, in der Milz bei 12,1% und 10,3% und im peripheren Blut bei jeweils 9,1%. Bei diesen Tieren wurden  $7,72 \times 10^6$  bzw.  $6,91 \times 10^6$  AML-Zellen aus den Knochen und  $1,83 \times 10^6$  bzw.  $1,08 \times 10^6$  AML-Zellen aus den Milzen isoliert. Die Abbildung 3-21 illustriert beispielhaft diese Resultate mit durchflusszytometrischen Daten von einer Maus, die 61 Tage im Versuch war.

Bei der Auswertung des zweiten Transplantationsversuchs wurde von allen Mäusen ein Femur-Knochen für die Anfertigung histologischer Schnitte verwendet. Zum Nachweis humaner Zellen wurden die Schnitte immunhistologisch mit Antikörpern



**Abbildung 3-22: Histologie eines murinen Femurs nach der intravenösen Applikation untransduzierter AML-Zellen in das Tier.**

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte des Femurs einer Maus aus Experiment 2, der untransduzierte Zellen appliziert worden waren und die nach 61 Tagen aus dem Versuch genommen wurde. Das Bild A zeigt eine einfache Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochenmarkgewebes in 50facher Vergrößerung. In den Darstellungen B und C ist eine immunhistologische Färbung CD45-positiver Zellen (braun) in 100 facher bzw. 400facher Vergrößerung zu sehen, während Bild D braun gefärbte Myeloperoxidase-positive Zellen in 100facher Vergrößerung zeigt. Anhand der immunhistologischen Färbungen kann man deutlich die Infiltration des murinen Knochenmarks (blau) durch die humanen leukämischen Blasten (braun) erkennen.

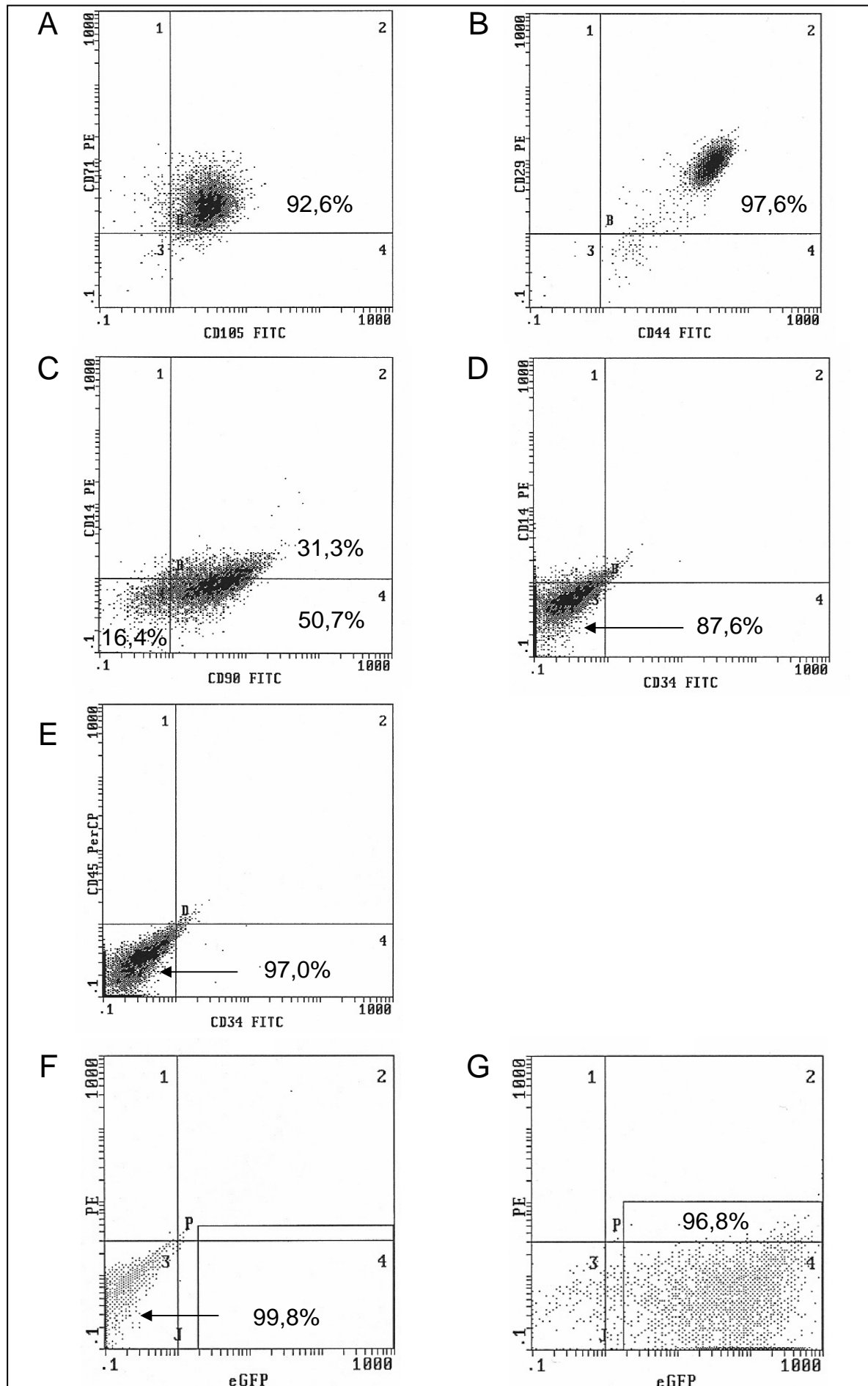
gegen das humane Leukozyten-Antigen CD45 und die Myeloperoxidase gefärbt. Die Präparate zeigten eine starke Infiltration des murinen Knochenmarks durch humane Zellen und bestätigten somit die durchflusszytometrischen Daten (siehe Abbildung 3-22).

### 3.6 Gentransfer in mesenchymale Stammzellen

Neben der Transduktion von physiologischen und leukämischen hämatopoetischen Vorläufer- bzw. Stammzellen wurde in der hier vorliegenden Dissertation in einer kurzen Versuchsreihe auch der Gentransfer in aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen untersucht. Diese pluripotenten Zellen sind in der Lage, in verschiedene mesenchymale Gewebe wie zum Beispiel Fett, Muskel und Knorpel auszudifferenzieren. Dieses hohe Differenzierungspotential und ihre guten *In-vitro*-Expansionseigenschaften machen sie für eine mögliche Verwendung bei Regeneration mesenchymaler Gewebe im Rahmen des so genannten „Tissue Engineering“ besonders interessant.

Insgesamt wurden drei Transduktionsversuche mit mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Der Gentransfer erfolgte einmalig über Nacht (siehe Abschnitt 2.4.10.2). Für die Transduktionen wurden lentivirale Überstände verwendet, die mit dem Zweiplasmidsystem hergestellt worden waren. Die Titer dieser Präparationen lagen zwischen  $1,8 \times 10^6$  IE/ml und  $3,4 \times 10^6$  IE/ml. Entweder ein oder vier Tage nach der Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde zum einen der Anteil an transduzierten Zellen durch Messung der *EGFP*-Expression ermittelt. Zum anderen wurde aber auch bei untransduzierten Zellen, die als Negativkontrollen mitgeführt worden waren, eine Oberflächentypisierung mit Hilfe der folgenden Antikörper durchgeführt: CD14 PE, CD29 PE, CD34 FITC, CD44 FITC, CD45 PerCP, CD71 PE, CD90 FITC und CD105 FITC (siehe Abbildung 3-25). Dabei zeigte sich, dass die Zellen positiv für die Oberflächenmarker CD29, CD44, CD71, CD90 und CD105 und negativ für die Marker CD34 und CD45 waren. Der Oberflächenmarker CD14 wurde auf den Zellen nur in sehr geringem Umfang exprimiert. In den drei Transduktionsversuchen ließen sich Gentransferraten von 96,7%, 98,9% und 84,1% erzielen. Es war also möglich, mit einer 16 stündigen





**Abbildung 3-23: Durchflusszytometrische Analyse mesenchymaler Stammzellen.**

Die Bilder (A) bis (E) zeigen die typische Oberflächentypisierung, die sich durch die gewählten Marker ergab. Die Zellen waren CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> und CD105<sup>+</sup>, dagegen aber negativ für die Marker CD34 und CD45. Der Oberflächenmarker CD14 wurde nur schwach exprimiert. Das Bild (G) zeigt die hohe Transduktionsrate, die in den mesenchymalen Zellen mit den lentiviralen Überständen erreicht wurde. In Bild (E) ist eine entsprechende Negativ-Kontrolle dargestellt.

Transduktionsrunde einen sehr hohen Anteil an *EGFP*-exprimierenden Zellen zu generieren.

## 4 Diskussion

Die genetische Modifikation hämatopoetischer Zellen durch retrovirale Vektoren stellt eine vielversprechende neuere Möglichkeit zur Behandlung von Krankheiten des blutbildenden Systems dar. In der letzten Zeit haben klinische Studien zur Behandlung der Granulomatose (X-linked chronic granulomatous disease) [Ott et al., 2006] und der verschiedenen Formen der SCID-Krankheit [Aiuti et al., 2002; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2003] sowohl das Potential, aber auch die Risiken dieser Technik aufgezeigt. Bisher kamen im Rahmen dieser klinischen Anwendungen vorwiegend sogenannte gammaretrovirale Vektorsysteme zum Einsatz, die beispielsweise auf dem „murine leukemia virus“, dem „Rous sarcoma virus“ oder dem „avian leukosis virus“ basieren [Pages und Bru, 2004; Verma und Weitzman, 2005]. Mittlerweile rücken mit Lenti- und Foamyviren zwei weitere retrovirale Vektorsysteme zunehmend in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Beide viralen Systeme besitzen Charakteristika, die sie zu potentiellen Alternativen bei gentherapeutischen Ansätzen machen. Insbesondere die Tatsache, dass sowohl Foamy-, als auch Lentiviren ruhende Zellen transduzieren können [Trobbridge and Russell, 2004], eröffnet neue Möglichkeiten bei der genetischen Manipulation von Stammzellen. Doch es sind noch weitere Studien erforderlich, die das Potential dieser Vektorsysteme untersuchen und die vorhandenen Schwierigkeiten bei deren Anwendung analysieren. Denn auch bei den neuen Generationen von retroviralen Vektoren treten immer noch Probleme auf, die eine weitere Verbesserung dieser Systeme notwendig machen. So kommt es beispielsweise in embryonalen, neuralen und hämatopoetischen Stammzellen, die mit gammaretroviralen oder lentiviralen SIN-Vektoren transduziert worden waren, in einem gewissen Umfang zum so genannten „Silencing“, also zum unerwünschten Expressionsverlust der proviralen Vektor-DNA [Ellis, 2005].

### 4.1 Herstellung und Titration retroviraler Überstände

Im Rahmen dieser Arbeit sollten lenti-, foamy- und gammaretrovirale Vektorsysteme für vergleichende Gentransferversuche in physiologische und leukämische



hämatopoetische Zellen verwendet werden. Zu Beginn der vorliegenden Promotion gab es nur recht wenig valide Literatur zu diesem komplexen Themenbereich und es bestand ein großes Interesse, die entsprechenden Techniken auch im eigenen Labor zu etablieren. Um dies jedoch zu ermöglichen, mussten zunächst Protokolle für die transiente Herstellung hochtitriger lentiviraler und foamyviraler Überstände etabliert werden. Die transiente Transfektion ist die am weitesten verbreitete Technik zur Generierung lentiviraler und foamyviraler Überstände, da es sich bei ihr um eine schnelle, einfache und sehr flexible Methode handelt [Blesch 2004; Coleman et al., 2003; Geraerts et al., 2005; Koldej et al., 2005; Mitta et al., 2005; Naldini et al., 1996b; Heinkelein et al., 2002a; Trobridge et al., 2002b]. So erlaubt sie beispielsweise im Gegensatz zu stabilen Produzentenzelllinien das rasche Testen verschiedener neuer Vektorsysteme und unterschiedlicher Möglichkeiten der Pseudotypisierung. Insbesondere aber ermöglicht sie die Verwendung zytotoxischer Transgene und Vektorkomponenten, um die es sich im Fall einiger lentiviraler und foamyviraler Proteine [Bartz et al., 1996; Konvalinka et al., 1995; Li et al., 1995; Miyazaki et al., 1995; Herchenroder et al., 1999], und des häufig für die Pseudotypisierung verwendeten Glykoproteins des „vesicular stomatitis virus“ [Burns et al., 1993] handelt. Diese würden auf Dauer stabile Linien abtöten.

Mittlerweile wurde aber trotzdem eine Reihe verschiedener stabiler Verpackungszelllinien für Lentiviren hergestellt [Farson et al., 2001; Kafri et al., 1999; Klages et al., 2000; Kumar et al., 2003; Ni et al., 2005; Pacchia et al., 2001; Xu et al., 2001]. Auch im Fall der Foamyviren wurden bereits stabile Verpackungszelllinien beschrieben, in denen die viralen Gene konstitutiv oder über einen induzierbaren Tetracyclin-regulierten Promotor exprimiert werden [Wu und Mergia, 1999]. Die Entwicklung einer solchen Verpackungszelllinie, die auch alle benötigten Vektorkomponenten exprimiert, nimmt jedoch sehr viel Zeit in Anspruch. Weitere Probleme bereitet oftmals auch die mangelnde Kompatibilität mit zytotoxischen beziehungsweise zytostatischen Transgenen oder anderen Vektorelementen, was eine restriktive Kontrolle der Genexpression mit sich bringt [Ni et al., 2005; Sinn et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit konnte für die Herstellung gammaretroviraler Überstände auf eine bereits etablierte stabile Linie zurückgegriffen werden, die bereits erfolgreich für die Transduktion hämatopoetischer Zellen verwendet worden war [Ebeling et al., 2007]. Es wurde daher in dieser Arbeit auf eine transiente Herstellung

gammaretroviraler Überstände verzichtet. Die Generierung lentiviraler und foamyviraler Überstände erfolgte dagegen aus den oben genannten Gründen mittels transienter Transfektion in 293T-Zellen, welche über das SV40 Large-T-Antigen verfügen. Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung besitzen, können durch das T-Antigen zusätzlich repliziert werden. In den transfizierten 293T-Zellen hat dies ein entsprechend gesteigertes Expressionsniveau der viralen Gene und des Transgens zur Folge. Bis heute findet diese Zelllinie für die Generierung lenti- und foamyviraler Überstände Verwendung [al Yacoub et al., 2007; Dull et al., 1998; Trobridge and Russell, 1998; Heinkelein et al., 2002a]. Sie wurde daher auch im Rahmen dieser Arbeit zur transienten Herstellung der Überstände verwendet.

Ein anderer wichtiger Aspekt bei der Transfektion ist die richtige Wahl des Transfektionsreagens. So handelt es sich beispielsweise bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation, die erstmalig vor über dreißig Jahren beschrieben wurde [Graham und van der Eb, 1973], um eine Technik, mit der man bei vergleichsweise geringem Kostenaufwand gute Transfektionseffizienzen erreichen kann. Daher ist sie im Fall der lentiviralen und foamyviralen Vektoren auch heute noch die am häufigsten verwendete Transfektionsmethode [Follenzi und Naldini, 2002; Trobridge und Russell, 1998; Vassilopoulos et al., 2001]. Diese Methode wird jedoch zunehmend durch andere, modernere Techniken ersetzt, die auf Verbindungen wie zum Beispiel kationischen Lipiden oder Polymeren basieren. Aus diesem Grund wurden zunächst fünf verschiedene Transfektionsreagenzien getestet: Calcium-Phosphat, Polyfect, FuGene 6, jetPEI und Lipofectamin 2000. Hierbei lag das vorrangige Ziel darin, möglichst hohe Titer zu generieren, die einen effizienten Gentransfer erlaubten. Dabei wurde im Fall der Calcium-Phosphat-Präzipitation auf bereits etablierte Protokolle zurückgegriffen, während bei den anderen Reagenzien die Durchführung entsprechend den Herstellerangaben erfolgte. Die vergleichenden Transfektionsversuche wurden mit dem foamyviralen Zweiplasmidsystem durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich mit allen verwendeten Transfektionsreagenzien reproduzierbar ähnlich hohe Titer zwischen  $3,6 \times 10^4$  und  $6,7 \times 10^3$  IE/ml generieren ließen. Dabei konnten mit Polyfect ( $2,7 \times 10^4$  IE/ml) und der  $\text{CaPO}_4$ -Präzipitation ( $3,6 \times 10^4$  IE/ml) die besten Ergebnisse erzielt werden. Jedoch sind selbst diese Titer im Vergleich zur Literatur, in der von unkonzentrierten Vektor-Titern von  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  IE/ml berichtet wird, sehr niedrig [Trobridge et al., 2002b; Wu und Mergia, 1999]. Bei anschließenden Transfektionsversuchen, die

unter Verwendung der  $\text{CaPO}_4$ -Präzipitation und des foamyviralen Vierplasmidsystems durchgeführt worden waren, lagen die erzielten Titer mit durchschnittlichen  $1,1 \times 10^4$  IE/ml sogar noch niedriger. Dem gegenüber wurde die  $\text{CaPO}_4$ -Präzipitation erfolgreich zur Herstellung lentiviraler Überstände eingesetzt. So wurden unter Verwendung des Zweiplasmidsystems Titer von durchschnittlich  $2,4 \times 10^6$  IE/ml erreicht. Dagegen erzielte das zum Vergleich eingesetzte FuGene 6 nur um die  $6,1 \times 10^5$  IE/ml. Im Verlauf dieser Arbeit konnten die lentiviralen Titer durch die Verwendung eines moderneren Vierplasmidsystems ( $4,8 \times 10^6$  IE/ml) nochmals verbessert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben in der Literatur. Die dort beschriebenen lentiviralen Titer, die durch transiente Transfektionen auf 293T-Zellen und unter Verwendung der  $\text{CaPO}_4$ -Präzipitation generiert wurden reichen, je nach Design der verwendeten Vektoren und je nach eingesetzter Titrationsmethode, von  $10^5$  bis  $10^8$  infektiöse Einheiten pro ml [Chang und Zaiss 2002; Follenzi und Naldini, 2002; Mitta et al., 2005; Reiser, 2000].

Eine Erklärung für die niedrigen foamyviralen Titer zu finden ist nicht einfach. Es kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, dass eines oder mehrere der verwendeten Plasmide, zum Beispiel aufgrund von Mutationen, nicht ausreichend exprimiert wurden. Darüber hätte nur eine Sequenzierung der Plasmide oder ein Western-Blot Aufschluss gegeben. Aus logistischen Gründen fand diese jedoch nicht statt. Darüber hinaus darf nicht vergessen werden, dass die Gesamtmenge an Plasmid-DNA, die in dem Transfektionsmix eingesetzt wird, einen großen Einfluss auf den Titer und somit auch auf die Infektiosität der retroviralen Überstände haben kann [al Yacoub et al., 2007]. Auch das Mengenverhältnis zwischen den einzelnen Vektorkomponenten im Transfektionsmix ist wichtig und kann den Titer maßgeblich beeinflussen. So konnten Segura et al. in einer ihrer Arbeiten zeigen, dass die höchsten lentiviralen Titer erzielt wurden, wenn die absolute DNA-Menge des Vektors, der das Transgen trägt, die jeweilige Menge der anderen Plasmide, auf denen die Struktur-, Hüll-, oder akzessorischen Gene lagen, im Transfektionsmix überstieg [Segura et al., 2007]. Dieser Befund wird durch Arbeiten anderer Gruppen untermauert, die ebenfalls bei transienten Transfektionen verhältnismäßig höhere absolute DNA-Mengen des Transgen-Vektors einsetzen [Dull et al., 1998; Follenzi und Naldini, 2002; Geraerts et al., 2005; Naldini et al., 1996b]. Der Einfluss des Mengenverhältnisses auf die Effizienz der Transfektion würde die Unterschiede zwischen den Titern der beiden lentiviralen Vektorsysteme, die im Rahmen dieser

Arbeit verwendet wurden, erklären. So waren die Titer des Zweiplasmidsystems, bei dem von jedem Vektor je 10 µg in den Transfektionsmix eingesetzt wurden, nur halb so hoch, wie die des Vierplasmidsystems. Bei dessen Verwendung wurden im Vergleich zu den anderen Plasmiden deutlich höhere absolute DNA-Mengen des Transgen-Vektors für die Transfektion benutzt (siehe Abschnitt 2.4.6). Auch im Fall der beiden foamyviralen Vektorsysteme wurden bei einer Transfektion jeweils 10 µg von jedem Plasmid verwendet. Auch wenn in der Literatur Beispiele belegen, dass mit diesen Mengenverhältnissen hohe Titer erreicht werden konnten [Trobridge et al., 2002b], kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch weiterführende Transfektionsversuche mit unterschiedlichen DNA-Mengen der verwendeten Plasmide Verbesserungen bei den foamyviralen Titern hätten erreicht werden können. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bei der Optimierung der viralen Titer immer nur mit unterschiedlichen absoluten DNA-Mengenverhältnissen gearbeitet wurde. Dabei ist es durchaus möglich, dass auch die molaren Verhältnisse zwischen den einzelnen Plasmiden einen Einfluss auf die Effizienz der Transfektion haben können. Dieser Fragestellung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen jedoch nicht nachgegangen. Zusammenfassend bleibt also festzuhalten, dass sich in dieser Arbeit die Calcium-Phosphat-Präzipitation als Methode der Wahl erwies, da sie es sowohl im Fall der Lentiviren, als auch bei den Foamyviren ermöglichte, mit geringem finanziellen und zeitlichen Aufwand vergleichsweise hohe Titer reproduzierbar zu generieren. Aus diesem Grund wurde sie dann auch nachfolgend zur transienten Herstellung der viralen Überstände eingesetzt.

Bei der Diskussion von Titern darf man nicht die verwendete Titrationmethode außer Acht lassen. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, virale Überstände zu titrieren. Diese lassen sich grob in Techniken zur Bestimmung des funktionalen Titers und des nicht-funktionalen Titers einteilen. Zu letzteren gehören beispielsweise ELISA-Untersuchungen zur Detektion des lentiviralen p24-Antigens und die Bestimmung der genomischen RNA-Konzentration mittels semi-quantitativen Northern-Blots oder qRT-PCR. Diese Techniken schätzen den funktionalen Titer zu hoch ein und bringen eine Reihe von Nachteilen mit sich. So enthält zum Beispiel der P24-Proteinpool, der durch einen ELISA-Assay quantifiziert wird, eine variable Menge von freiem P24 und solchem P24, das von nicht-funktionalen Vektor-Partikeln stammt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die generierten viralen Überstände zur Transduktion von normalen und malignen hämatopoetischen Zellen verwendet

werden. Bei einem solchen experimentellen Ansatz steht also die Funktionalität der Titer im Vordergrund. Daher würden Methoden zur Bestimmung des nicht-funktionalen Titers in diesem Fall nicht die relevanten Informationen liefern, die benötigt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Titration der viralen Überstände in der vorliegenden Arbeit durch eine graduelle Verdünnung der viralen Überstände, die anschließende Transduktion von HT1080-Zellen mit diesen Verdünnungen und die spätere Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie. Dies ist eine einfache und etablierte Methode zur Bestimmung der infektiösen viralen Partikelzahl im Überstand. Dennoch muss man sich vor Augen halten, dass es sich bei den erhaltenen Werten aufgrund der Natur dieser Technik um keine exakten Zahlen handelt. So erlaubt diese Methode beispielsweise keine Differenzierung zwischen einfachen und mehrfachen Integrationen in einzelnen Zellen. Die erhaltenen Messwerte ermöglichen stattdessen nur eine Abschätzung der Qualität der hergestellten Überstände. Auch der Vergleich der eigenen Titer mit denen anderer Arbeitsgruppen ist problematisch, da die einzelnen Titrations-Protokolle in Details von einander abweichen und der funktionelle Titer zudem von den verwendeten Vektorkonstrukten und den für die Titration verwendeten Zellen abhängig ist. Hier könnten standardisierte Titrations-Protokolle in einem gewissen Umfang Abhilfe schaffen.

Das Aufkonzentrieren retroviraler Überstände ist mittlerweile eine gängige Methode, um die Titer zu erhöhen und Verunreinigungen durch beispielsweise Zell-Debris aus dem Überstand zu entfernen. Am häufigsten erfolgt dies durch Ultrazentrifugation, wobei mittlerweile auch andere Techniken, wie zum Beispiel die Ultrafiltration [Reiser, 2000] oder die Aufreinigung über Säulen mittels biotinyliertem VSV-G [Nesbeth et al., 2006], beschrieben wurden. In der Regel werden aber nur der Faktor der Anreicherung und der maximale Titer beschrieben, nicht aber die erzielte Ausbeute. Dabei kann der Verlust an viralen Partikeln durch das Aufkonzentrieren gravierend sein. So beschreiben zum Beispiel Yacoub et al., dass die Rückgewinnung lentiviraler Partikel mit großen Inserts während der Ultrazentrifugation stark reduziert sein kann [al Yacoub et al., 2007]. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit generierten lentiviralen Titer waren für die durchgeführten Transduktionsversuche ausreichend. Daher war das Aufkonzentrieren der Überstände nicht erforderlich, weshalb darauf verzichtet wurde. Allerdings wurden bei den Versuchen die potentiellen toxischen Eigenschaften der

Überstände außer Acht gelassen. Es wäre möglich, dass durch aufkonzentrierte, und somit auch aufgereinigte Überstände noch höhere Transduktionsraten hätten erreicht werden können. Im Fall der foamyviralen Vektorsysteme waren bereits die Titer der unkonzentrierten Überstände sehr niedrig. Daher wäre auch durch das Aufkonzentrieren keine ausreichende Anreicherung der Viruspartikel, die eine effiziente Transduktion der physiologischen und malignen, hämatopoetischen Zellen ermöglicht hätte, zu erwarten gewesen. Aus dem Grund wurde auch in diesem Fall darauf verzichtet.

## **4.2 Vergleichender Gentransfer mit unterschiedlichen retroviralen Vektorsystemen**

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Transduktionsversuche, mit denen das Potential der drei Vektorsysteme evaluiert werden sollte, wurden neben primären leukämischen Zellen und Zelllinien auch primäre humane CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen verwendet. Bei diesen Versuchen mit den hämatopoetischen Stammzellen stand der Test von drei unterschiedlichen Protokollen im Vordergrund. So gab es ein kurzes Protokoll, bei dem unstimulierte Zellen nur einmal über Nacht transduziert wurden (Protokoll 1). Im Gegensatz dazu wurden bei den beiden anderen Protokollen die Zellen zunächst für 24 h mit geeigneten Zytokinen prästimuliert und anschließend entweder einmal für 16 h (Protokoll 2) oder an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 6 h (Protokoll 3) im entsprechenden retroviralen Überstand kultiviert. Der Grund für die unterschiedlichen Protokolle liegt in der Tatsache begründet, dass lentivirale und foamyvirale Vektoren auch ruhende Zellen transduzieren können und daher nicht auf die Prästimulation der Zellen angewiesen sein sollten. Zudem werden immer noch mögliche Effekte von verlängerten *In-vitro*-Kulturperioden auf die Transduktionseffizienz und die Fähigkeit der Stammzellen zu repopulieren kontrovers diskutiert [Ballen et al., 2000; Dorrell et al., 2000; Rice et al., 2001].

Bei der Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen gibt es eine Reihe von Faktoren, die einen Einfluss auf die Gentransfer-Effizienz haben können. Ein solcher Faktor wäre beispielsweise die Quelle der hämatopoetischen Stammzellen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden nach *In-vivo*-Mobilisierung durch Zytokingabe aus Apheresaten des peripheren Blutes

isoliert. Die Entnahme von zytokinmobilisierten Zellen des peripheren Blutes zur Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen genießt mittlerweile deutlichen Vorzug vor der Ernte von Zellen aus dem Knochenmark, da diese Methode die Gewinnung größerer Mengen an CD34<sup>+</sup>-Zellen ermöglicht [Ferguson et al., 2005]. So konnten bei den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungen zwischen  $4 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup>-Zellen aus kleinen Proben-Volumina von 2,5 bis 5 ml isoliert werden. Außerdem zeigte eine Reihe von Untersuchungen, dass diese Technik auch die Engraftment-Dauer erheblich verkürzt. So ermöglichten Stammzellen, die nach der Mobilisierung mit SCF und G-CSF gewonnen wurden, gewöhnlich eine Wiederherstellung der Hämatopoese in nicht humanen Primaten und Patienten in weniger als vier Wochen [Andrews et al., 1995; Glaspy et al., 1997]. In Primaten-Modellen verbesserte, verglichen mit unbehandeltem Knochenmark oder Zellen, die nur mit G-CSF mobilisiert worden waren, die Verwendung von mobilisierten Stammzellen aus peripherem Blut oder Knochenmark, das nach der Verabreichung von SCF und G-CSF geerntet worden war, die Gentransfer-Effizienz [Dunbar et al., 1996]. Die kombinierte Verwendung der Zytokine SCF und G-CSF steigerte auch die Mobilisierung der langzeit-repopulierenden Stammzellen bei Mäusen [Fleming et al., 1993; Dunbar et al., 1996]. Auch in der hier vorliegenden Promotionsarbeit bestätigten sich die Vorteile von zytokinmobilisierten Zellen des peripheren Blutes bei der einfachen Gewinnung von größeren Mengen an CD34<sup>+</sup>-Zellen aus kleinen Proben-Volumina und der anschließenden effizienten Transduktion der Zellen.

Weiterhin spielt auch die Verwendung von Zytokinen und die damit verbundene Dauer der Transduktionsprotokolle bei Gentransfer-Versuchen eine bedeutende Rolle. Lentivirale und foamyvirale Vektoren sind prinzipiell besser für die Verwendung in kurzen Transduktionsprotokollen geeignet als gammaretrovirale Vektorsysteme, da aufgrund ihrer Fähigkeit, auch ruhende Zellen zu infizieren, die Prästimulation der Zielzellen nicht zwangsweise erforderlich ist. So wurde gezeigt, dass lentivirale Gentransfer-Protokolle mit sehr kurzen Kulturperioden in einer breiteren klonalen Verteilung innerhalb von transduzierten humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen, welche in sublethal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen repopulieren können, resultierten [Mazurier et al., 2004]. Es überrascht daher nicht, dass es eine Vielzahl an verschiedenen Transduktionsprotokollen für lentivirale Vektorsysteme gibt. Bei einigen wird auf die initiale Prästimulation mit Wachstumsfaktoren, die bei Transduktionen mit gammaretroviralen Vektoren notwendig ist, verzichtet, während

in anderen Protokollen auch weiterhin die Zellen vor dem eigentlichen Transduktionsschritt durch Zugabe von Zytokinen aktiviert werden. Auch im Fall der foamyviralen Vektoren gibt es Arbeitsgruppen, die vorzugsweise kurze Transduktionsprotokolle verwenden [Josephson et al., 2004]. Gegenwärtig ist man sich aber darin einig, dass die Verwendung von Zytokinen vorteilhaft für die Transduktion ist und grundsätzlich nicht die Fähigkeit der Vorläuferzellen zur Repopulierung beeinträchtigt [Zielske und Braun, 2004; Logan et al., 2002; Santoni de Sio et al., 2006]. Ein Cocktail, der aus den Wachstumsfaktoren SCF, Trombopoetin und Flt-3 besteht, scheint die Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen zu stimulieren ohne aber deren Engraftment-Potential zu beeinträchtigen während es gleichzeitig die Gentransfer-Effizienz verbessert [Mostoslavsky et al., 2005; Logan et al., 2002; Wognum et al., 2000]. Daher wurde dieser Cocktail für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transduktionen übernommen und lediglich um den Wachstumsfaktor G-CSF erweitert.

Bisher ist noch nicht vollständig verstanden, auf welche Weise die Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Transduktionseffizienz beitragen. Allerdings gibt es Studien, die zeigen, dass eine Steigerung von lentiviralen Transduktionsraten durch Zytokine in hämatopoetischen Stammzellen zumindest teilweise auf eine Herabregulierung der proteosomalen Aktivität zurückzuführen ist [Santoni de Sio et al., 2006]. Die Signalkaskaden, die hierbei eine Rolle spielen, sind noch unbekannt. Darüber hinaus hat die Mobilisierung der Zellen in Kombination mit anderen Kulturbedingungen vermutlich auch Einfluss auf wichtige Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel jenem, der die Expression von CXCR4 hochreguliert [Peled et al., 1999]. Die Überexpression dieses Rezeptors in hämatopoetischen Vorläuferzellen steigert deren Expansion und Fähigkeit zur Repopulierung [Kahn et al., 2004].

Zuletzt sei noch kurz der Einfluss von Fibronektin, auf welchem die Transduktionen durchgeführt wurden, auf die Transduktionsraten erwähnt. Die Steigerung der Gentransfer-Effizienz durch Fibronektin wird der Kolo-kalisation von Vektorpartikeln, die sich an dessen heparinbindende Region anlagern, und Zellen, welche sich an die VBLA-4- und VLA-5-Bindungsstellen anheften, zugeschrieben [Hanenberg et al., 1996]. Die Fähigkeit von Fibronektin, die Transduktion mit VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Vektoren zu verbessern, wird in der Literatur zwar kontrovers diskutiert



[Haas et al., 2000; Donahue et al., 2001]; es trägt jedoch in jedem Fall dazu bei, das Engraftment-Potential der hämatopoetischen Stammzellen und deren regenerative Fähigkeiten zu erhalten [Dao et al., 1998; Yokota et al., 1998; Sellers et al., 2004].

Betrachtet man die Resultate der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transduktionsversuche, so fällt zunächst auf, dass bei Einsatz der foamyviralen Überstände kein effizienter Gentransfer möglich war. Unabhängig vom verwendeten Protokoll wurden durchschnittlich stets Gentransferraten von unter einem Prozent erreicht. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit Angaben in der Literatur, welche zeigen, dass prinzipiell auch in hämatopoetischen Vorläuferzellen mit foamyviralen Vektorsystemen Transduktionsraten von über 50% erzielt werden können [Josephson et al., 2002; Leurs et al., 2003]. Im vorliegenden Fall sind die erhaltenen Resultate allerdings nicht verwunderlich, da die verwendeten Überstände sehr niedrige Titer hatten, so dass hohe Transduktionsraten nicht zu erwarten waren. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch noch andere Faktoren bei diesen schlechten Gentransfer-Effizienzen eine Rolle spielten. So zeigten interessanterweise von Laer et al. in einer Studie, dass der Eintritt von retroviralen Vektoren, die mit foamyviralen Hüllproteinen pseudotypisiert worden waren, in hämatopoetische Vorläuferzellen stark eingeschränkt ist. Die Autoren führten dies auf eine unzureichende Expression foamyviraler Rezeptoren auf den Zellen zurück [von Laer et al., 2001]. Dem gegenüber stehen mittlerweile jedoch zahlreiche Publikationen, die einen effizienten Gentransfer in humane, hämatopoetische Vorläuferzellen mit foamyviralen Vektorsystemen belegen [Trobridge et al., 2002b; Josephson et al., 2004]. Zudem kann ausgeschlossen werden, dass die 24stündige Kulturperiode zwischen dem Ende der Transduktion und der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen zu kurz für eine effiziente Expression des Transgens war. So konnten Briones et al. zeigen, dass durch eine Analyse der *EGFP*-Expression, die bereits 24 Stunden nach Abschluss der Transduktion durchgeführt wird, die Gentransferraten nicht unterschätzt werden [Briones et al., 1999]. Darüber hinaus wurde in anderen Arbeiten nachgewiesen, dass *EGFP* bereits neun Stunden nach einer retroviralen Transduktion exprimiert werden kann [Levy et al., 1996]. Letztendlich bleiben die Gründe für das Versagen des foamyviralen Systems in dieser Arbeit unklar.

Im Gegensatz zu den foamyviralen Überständen war mit den lentiviralen und gammaretroviralen Vektorsystemen ein effizienter Gentransfer in die

hämatopoetischen Stamm- / Vorläuferzellen möglich. So konnten im Fall der Lentiviren unter Verwendung von Protokoll 1 durchschnittlich Transduktionsraten von etwa 4%, und mit dem Protokoll 2 mittlere Gentransferraten von ca. 28% erreicht werden. Damit waren bei diesen beiden Protokollen die mit dem lentiviralen System erreichten Transduktionsraten besser als die, die mit dem gammaretroviralen System erzielt wurden. Diese lagen durchschnittlich bei etwa 2% für Protokoll 1 und ca. 23% für Protokoll 2. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das lentivirale System bei kürzeren Transduktionsprotokollen leichte Vorteile hat. Das Gegenteil scheint jedoch bei einer langen und wiederholten Exposition der Zellen gegenüber den viralen Vektoren der Fall zu sein. Denn interessanterweise konnten unter Verwendung des Protokolls 3, bei dem die Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils sechs Stunden transduziert wurden, mit dem gammaretroviralen Vektorsystem höhere Gentransferraten erzielt werden (ca. 35%) als mit dem lentiviralen System (ca. 24%).

Mittlerweile haben eine Vielzahl an Untersuchungen in der Forschung und im Rahmen klinischer Studien das Potential von gammaretroviralen Vektoren für den Gentransfer in CD34<sup>+</sup>-Zellen überzeugend dargelegt [Barquinero et al., 2000; Ott et al., 2006]. Zudem werden die in der vorliegenden Arbeit erzielten gammaretroviralen Transduktionsraten durch weitere Resultate aus der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt [Ebeling et al., 2007]. Inzwischen gibt es auch zahlreiche Publikationen, die einen effizienten Gentransfer mit lentiviralen Vektorsystemen in hämatopoetische Stammzellen beschreiben [Guenechea et al., 2000; Scherr et al., 2002]. Zwar werden in der Literatur für beide Vektorsysteme oftmals Gentransfer-Effizienzen angegeben, die höher sind als die in dieser Arbeit generierten Daten, jedoch werden in diesen Fällen in der Regel aufkonzentrierte und somit sehr hochtitrige Überstände verwendet. Dies hat auch letztendlich zur Folge, dass die Transduktionen mit einer deutlich höheren MOI durchgeführt werden. Die stetige Verbesserung der Gentransferraten mit zunehmender Dauer der Transduktionsprotokolle, die bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihe zu beobachten war, dürfte, insbesondere im Fall der gammaretroviralen Vektoren, mit einer erhöhten Mobilisierung der Stamm- / Vorläuferzellen über die Zeit, welche mit einem zunehmenden Eintritt in den Zellzyklus einhergeht, zu erklären sein. Ein interessanter Aspekt ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass bei Verwendung des Protokolls 3 mit den gammaretroviralen Überständen höhere

Transduktionsraten erreicht wurden als mit den lentiviralen Präparationen. Ein möglicher Grund hierfür mag in der langen und wiederholten Exposition der Zellen gegenüber den lentiviralen Partikeln liegen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei das VSV-G-Hüllprotein und andere lentivirale Vektorkomponenten durch ihre toxischen Eigenschaften die Vitalität der Zellen maßgeblich beeinträchtigt haben. Durchflusszytometrische Färbungen mit 7-Amino Actinomycin D oder Propidiumjodid hätten über die Vitalität der transduzierten Zellen Aufschluss geben können. Aus logistischen Gründen wurden diese jedoch nicht durchgeführt. In jedem Fall zeigten die Versuche, dass unter Verwendung von lentiviralen und gammaretroviralen Vektorsystemen auch mit kurzen Transduktionsprotokollen ein effizienter Gentransfer möglich ist. Wie bereits diskutiert wurde, sind solche kürzeren Protokolle vorzuziehen, da mögliche negative Auswirkungen auf die Transduktionseffizienz und die Fähigkeit der Stammzellen zu repopulieren durch lange *In-vitro*-Kulturperioden nicht ausgeschlossen werden können. Bei *In-vivo*-Anwendungen besteht zudem ein weiteres, potentiell Problem in der Tatsache, dass die Exposition der hämatopoetischen Zellen gegenüber retroviralen Partikeln negative Auswirkungen auf den sogenannten „Homing“-Effekt, also die Zielsuche der transduzierten Zellen zum Knochenmark, hat. So konnten Hall et al. in ihren Arbeiten zeigen, dass, verglichen mit untransduzierten Kontrollen, die Rückgewinnung von humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen im Fall von transduzierten Zellen signifikant erniedrigt war [Hall et al., 2006]. Interessanterweise kann der Verlust des „Homings“ anscheinend durch eine zweitägige Ruhephase der Zellen in Anwesenheit von SCF und Fibronectin rückgängig gemacht werden. Während dieser Zeit scheint SCF das Überleben der Zellen zu gewährleisten, während Fibronectin über Signaltransduktionswege, die unter anderem anscheinend durch die Interaktion zwischen VAL-4 und der CS1-Bindungsstelle des Fibronectins induziert werden, apoptotische Vorgänge verhindert. Auf diese Weise werden die transduzierten Zellen am Leben erhalten und gleichzeitig die Induzierung weiterer Zellzyklen verhindert. Da sich unter Verwendung der lentiviralen und gammaretroviralen Vektoren die beiden kürzeren Protokolle 1 und 2 bewährt hatten, sollten diese anschließend auch im Rahmen der Gentransferversuche mit primären leukämischen Zellen getestet werden.

Die ersten Gentransferversuche in leukämischen Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden waren, erfolgten mit den beiden ALL-Zelllinien Jurkat und

RS. Sie dienten, ergänzend zu den Titrationen auf HT1080-Zellen, der Evaluation der Gentransfereffizienz der verschiedenen Vektorsysteme. Tatsächlich bestätigten die erzielten Transduktionsraten die aufgrund der Titrationen entstandenen Erwartungen. So wurden mit den foamyviralen Überständen in beiden Zelllinien Transduktionsraten von unter 10% erreicht. Im Gegensatz dazu konnten mit den beiden anderen Vektorsystemen Gentransferraten von etwa 80% in Jurkat-Zellen und nahezu 70% in RS-Zellen erzielt werden. Dass sich Leukämie-Zelllinien zumindest mit lentiviralen Vektoren effizient transduzieren lassen, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. So erzielten bereits 1998 Mascarenhas et al. mit einem älteren lentiviralen Dreiplasmidsystem, das *EGFP* als Transgen besaß, in den ALL-Zelllinien Nalm-6 und Reh Gentransferraten von 57%, beziehungsweise 88% [Mascarenhas et al., 1998]. Interessanterweise lag der Anteil der transduzierten Zellen unter Verwendung eines retroviralen MLV-Vektors, der ebenfalls das Transgen *EGFP* trug und GALV-pseudotypisiert war, im Fall der Zelllinie Nalm-6 um die 42% und in Reh-Zellen sogar unter 5%. Dagegen war in dieser Arbeit der gammaretrovirale Vektor hinsichtlich der Transduktionsraten gleichwertig zum lentiviralen Pendant. Solche Unterschiede in der Transduktionseffizienz von ALL-Zelllinien spiegeln vermutlich die heterogene Natur primärer ALL-Zellen wieder; welche vielleicht auf eine unterschiedlich starke Expression der notwendigen Oberflächenrezeptoren zurückzuführen sein könnte. Später erreichten Stripecke et al. mit einem lentiviralen bicistronischen CD80/GM-CSF-Vektor und einer MOI von 10 in der ALL-Zelllinie Nalm-6 und der AML-Zelllinie ML-1 Gentransferraten von über 95% [Stripecke et al., 2000]. Sie verwendeten anschließend lentivirale Vektoren auch erfolgreich zur Transduktion von primären Zellen akuter Leukämien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in den vorliegenden Transduktionsversuchen gewonnenen Daten die Titrationsergebnisse hinsichtlich des Potentials der einzelnen Vektorsysteme bestätigten und sich mit denen anderer Arbeitsgruppen deckten.

Bei akuten Leukämien handelt es sich um Neoplasien, die sich durch eine rasch progrediente Abnahme von reifen Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten auszeichnen. Dies geht oftmals mit einem gleichzeitigen Anstieg der Leukozytenzahl durch das Auftreten atypischer Rundzellen einher. Leukämische Blasten proliferieren, wenn überhaupt, nur in einem sehr geringen Umfang. Dies stellte bisher bei Gentransferversuchen stets ein großes Hindernis dar. Erst in jüngster Vergangenheit konnten unter Verwendung lentiviraler Vektorsysteme reproduzierbar

hohe Gentransferraten in primären leukämischen Zellen erreicht werden [Hope et al., 2004]. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gentransferversuche mit primären AML-Zellen führten zu ähnlichen Resultaten. Für die Transduktionen wurden die Protokolle 1 und 2 verwendet, da sie sich bei den Versuchen mit den primären hämatopoetischen Stammzellen als effizient erwiesen hatten. Neben lentiviralen Überständen, die sowohl mit dem Zweiplasmidsystem, als auch mit dem Vierplasmidsystem generiert worden waren, kamen zum Vergleich auch gammaretrovirale Präparationen zum Einsatz. Dabei zeigte sich, dass das lentivirale Vierplasmidsystem den anderen getesteten Vektorsystemen überlegen war. So konnten bei Einsatz von Protokoll 1 mit diesem Vektorsystem Transduktionsraten von über 40% erzielt werden, während der Anteil an transduzierten Zellen unter Verwendung von Protokoll 2 bei bis zu 75% lag. Dagegen erzielte das Protokoll 1 in Kombination mit dem lentiviralen Zweiplasmidsystem Gentransferraten von unter 7%, und auch im Fall der gammaretroviralen Vektoren lagen diese in der Regel nur um die 10%. Wurde das Protokoll 2 verwendet, so konnten in der Regel mit diesen beiden Vektorsystemen ebenfalls Transduktionsraten von um die 10% erreicht werden. Somit war mit allen drei Vektorsystemen ein effizienter Gentransfer in primäre AML-Zellen möglich, wobei allerdings das lentivirale Vierplasmidsystem die besten Ergebnisse erzielte. Zudem konnten mit dem Protokoll 2 tendenziell höhere Gentransferraten erreicht werden, als mit dem Protokoll 1. Beim Betrachten der Ergebnisse fallen die Unterschiede hinsichtlich der Gentransfereffizienz zwischen dem lentiviralen Zweiplasmidsystem und Vierplasmidsystem auf. Der primäre Grund für diese Diskrepanzen dürfte in der Tatsache begründet liegen, dass die mit dem Vierplasmidsystem hergestellten Überstände etwa doppelt so hohe Titer besaßen, wie jene, die mit dem Zweiplasmidsystem generiert worden waren. Aber auch das verbesserte Vektordesign des moderneren Vierplasmidsystems könnte eine Rolle gespielt haben. So mag es durchaus sein, dass beispielsweise das WPRE durch eine Erhöhung der Transgen-Expression zu einer Verbesserung der Transduktionsraten beigetragen hat. Das durch die hier beschriebenen Versuche aufgezeigte Potential lentiviraler Vektoren für die Transduktion von AML-Zellen wird in der Literatur auch durch andere Arbeiten bestätigt. So hat die Arbeitsgruppe um John Dick lentivirale Vektoren, die *EGFP* als Transgen tragen, erfolgreich für die Markierung und Identifizierung leukämischer Stammzellen im NOD/SCID-Mausmodell verwendet [Hope et al., 2004]. Dabei wurden unter Verwendung

einfacher Transduktionsprotokolle Gentransferraten von um die 40% erreicht. Auch die in dieser Arbeit beobachtete große Streuung der Transduktionsraten, die sich vermutlich in erster Linie auf die Heterogenität der akuten myeloischen Leukämiezellen zurückführen lässt, ist in anderen Arbeiten zu finden. So bewegte sich der Anteil an transduzierten AML-Zellen bei Koya et al. zwischen 23% und 72% [Koya et al., 2002]. Darüber hinaus wurden lentivirale Vektoren mittlerweile auch für den Transfer anderer Transgene verwendet. Ein Beispiel dafür ist die effiziente Expression der Immunmodulatoren CD80 und GM-CSF in AML-Zellen nach Transduktion mit lentiviralen Vektoren [Stripecke et al., 2000]. Bei all diesen Transduktionsversuchen lagen, abhängig vom Vektordesign, dem verwendeten Transduktionsprotokoll und dem Transgen, die verwendeten MOIs zwischen 10 und 30. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass bereits mit einer MOI von 10 ein effizienter Gentransfer in AML-Zellen erzielt werden konnte. Eine Erhöhung der MOI führte hier zu keiner Verbesserung der Transduktionsraten. Folgerichtig wurden für die anschließenden Versuche im NOD/SCID-Modell die AML-Zellen mit einer MOI von 10 transduziert.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den AML-Zellen, waren die drei Transduktionsversuche mit den ALL-Zellen nur wenig erfolgreich und ließen auch keine aussagekräftigen Rückschlüsse zu. In diesem Fall wurden ebenfalls Protokoll 1, bei dem unstimulierte Zellen einmal über Nacht transduziert wurden, und Protokoll 2, bei dem die Transduktion über Nacht mit prästimulierten Zellen erfolgte, getestet. Allerdings erfolgten die Transduktionen diesmal nicht nur auf Fibronectin, sondern auch auf einem Monolayer von CD40L produzierenden L-Zellen. Dies erschien sinnvoll, denn CD40L ist ein bedeutender Modulator des B-Zell-Kompartiments [Banchereau et al., 1994]. Die Interaktionen dieses Liganden mit dem entsprechenden Rezeptor CD40, der sowohl auf normalen, als auch malignen B-Zellen exprimiert wird, stimulieren bei B-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten die Proliferation, die Differenzierung und die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle. Zudem steigern sie auch die Präsentation von Antigenen. Sämtliche Gentransferversuche auf diesem Monolayer blieben jedoch erfolglos. Auch unter Verwendung von Fibronectin konnte nur sehr selten eine *EGFP*-Expression nachgewiesen werden. Im ersten von den drei Versuchen wurde bei Einsatz des Protokolls 1 mit lentiviralen Überständen, die mit dem Zweiplasmidsystem hergestellt

worden waren, eine Gentransferrate von etwa 0,3% erreicht, während der Anteil der transduzierten Zellen im Fall der gammaretroviralen Überstände bei etwa 0,5% lag. Unter Verwendung des Protokolls 2 wurde mit lentivralen Überständen ebenfalls eine Transduktionsrate von 0,3% erzielt. Als bei dem dritten Versuch lentivirale Überstände verwendet wurden, die mit dem Vierplasmidsystem generiert worden waren, konnte mit dem Protokoll 2 immerhin eine Gentransferrate von nahezu 11% erreicht werden. Dagegen lag bei Verwendung der gammaretroviralen Überstände der Anteil an transduzierten Zellen nur bei 1,6%. Für diese im letzten Versuch erreichten 11% kann vermutlich auch hier der im Vergleich zum Zweiplasmidsystem höhere Titer des lentiviralen Vierplasmidsystems verantwortlich gemacht werden. Doch können Transduktionen von ALL-Zellen auf Fibronectin möglicherweise auch noch auf andere Art und Weise beeinflusst werden. So exprimieren ALL-Zellen zwar die für die Bindung an Fibronectin notwendigen Rezeptoren VLA-4 und VLA-5, jedoch konnten in einer Untersuchung bei einer Reihe von ALL-Patienten VLA-4-vermittelte Adhäsionsdefekte nachgewiesen werden, die auf eine Expression von nicht-funktionellem VLA-4 an der Zelloberfläche zurückzuführen waren [Geijtenbeek et al., 1999]. Dabei könnten beide Rezeptoren sehr wichtig für das Überleben und die Proliferation der ALL-Blasten sein. So wurde gezeigt, dass VLA-4 und VLA-5 wichtig für die Bindung der ALL-Blasten an das Knochenmarkstroma sind [Bradstock et al., 1993; Ryan, 1993; Makrynika und Bradstock, 1993], und Manabe et al. haben nachgewiesen, dass dieser Zellkontakt mit den Stromazellen die Apoptose der ALL-Blasten verhindern kann [Manabe et al., 1992]. Vergegenwärtigt man sich die bereits diskutierte Beobachtung, dass anscheinend die Bindung von hämatopoetischen Vorläuferzellen an Fibronectin apoptotische Vorgänge verhindert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch für das Überleben, und somit auch die Transduktion der sehr fragilen ALL-Blasten, die *In-vitro* nur für sehr kurze Zeit am Leben erhalten werden können, die Bindung an Fibronectin via VAL-4 und VAL-5 von großer Bedeutung ist. Letztendlich stehen die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Transduktionsversuche von ALL-Zellen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Zwar ist bei dieser Thematik die Literatur sehr begrenzt, doch insbesondere die Arbeiten von Stripecke und Kollegen zeigen, dass sich auch primäre ALL-Zellen erfolgreich transduzieren lassen [Stripecke et al., 2000]. In ihren Arbeiten erreichten die Autoren durch die Transduktion von primären ALL-Zellen mit einem lentiviralen CD80/GM-CSF –Tandemvektor Gentransferraten

von durchschnittlich 64%. Die Expression dieser beiden Immunomodulatoren soll eine Differenzierung der ALL-Blasten in „leukämische antigenpräsentierende Zellen“ bewirken. Diese könnten dann das Immunsystem zu Antworten gegen die körpereigenen Leukämiezellen anregen. Diese ist nur ein Beispiel für eine mögliche Verwendung von lentiviralen Vektoren zur Behandlung hämatopoetischer Erkrankungen.

Neben akuten Leukämien wurden lentivirale Vektoren mittlerweile auch erfolgreich für den Gentransfer in andere Neoplasien, wie zum Beispiel dem Multiplen Myelom, verwendet [De Vos et al., 2003]. Auch hier übertrafen die lentiviralen Vektoren bei vergleichbaren Transduktionsbedingungen die anderen getesteten Vektorsysteme, sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils an transduzierten Zellen, als auch bei der Fluoreszenzintensität des verwendeten Transgens *EGFP*. Es zeigt sich also immer deutlicher, dass lentivirale Vektoren die besten Vehikel für den Gentransfer in akute Leukämien sind, denn sie ermöglichen einen effizienten Gentransfer ohne toxische Effekte in primäre Leukämiezellen, welche *In-vitro* kaum proliferieren und replizieren.

Das menschliche Knochenmark besteht aus einer sehr heterogenen Population aus hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen. Zu den letzteren gehören auch die sogenannten mesenchymalen Stammzellen, die in der Lage sind, verschiedene mesodermale Gewebetypen, wie zum Beispiel Knochen, Knorpel oder Fett, aufzubauen [Pittenger et al., 1999; Deans et al., 2000] und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu unterstützen [Angelopoulou et al., 2003]. Mesenchymale Stammzellen sind daher nicht nur für die Transplantationsmedizin von Interesse, sondern stellen auch potentielle Zielzellen für die *Ex-vivo*-Gentherapie dar. So gab es in den letzten Jahren verschiedene Studien, in denen die Möglichkeit untersucht wurde, mesenchymale Stammzellen, die *Ex-vivo* mit viralen Vektoren transduziert worden waren und welche den Knochenwachstumsfaktor (Bone Morphogenic Protein) BMP-2 trugen, zur therapeutischen Behandlung von Erkrankungen der Muskulatur und des Skeletts, wie zum Beispiel der Osteoporose, einzusetzen [Reiser et al., 2005]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie effizient sich mesenchymale Stammzellen mit Hilfe der sehr gut funktionierenden lentiviralen Vektoren, sowie unter Verwendung eines einfachen und kurzen Protokolls transduzieren lassen.



Die Population der mesenchymalen Stammzellen besitzt eine sehr heterogene Natur. Es überrascht daher nicht, dass bis heute die Isolierung einer „reinen“ Population von multipotenten Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma schwer möglich ist. Einen Schritt in diese Richtung wurde mit der Entwicklung des monoklonalen Antikörpers gegen Stro-1, das auf Stromazellen stark exprimiert wird, getan [Gronthos et al., 1994]. Zahlreiche Studien, die sich mit der Expression von Oberflächenmarkern auf diesen Zellen beschäftigt haben, zeigten, dass die Population der mesenchymalen Stammzellen in ihrer Gesamtheit viele Eigenschaften von Fibroblasten, wie zum Beispiel die Expression von Matrixproteinen, besitzt. Darüber hinaus exprimiert sie Marker von Myofibroblasten, darunter das sogenannte „ $\alpha$ -smooth muscle actin“, und weist nicht zuletzt aufgrund der Expression von Endoglin (CD105) auch Charakteristiken von Endothelialzellen auf [Gronthos und Simmons, 1996; Simmons et al., 1994; Pittenger et al., 1999; Gronthos et al., 2000]. Weitere Oberflächenantigene, die man unter anderem auf mesenchymalen Stammzellen gefunden hat, sind Thy-1, c-kit [Colter et al., 2000; Stewart et al., 1999], SH-2, SB-10, CD44, das  $\beta$ -1 Integrin CD29 und der Transferrin-Rezeptor CD71 [Bruder et al., 1997; Bruder et al., 1998]. Dem gegenüber werden typische hämatopoetische Antigene, wie zum Beispiel CD45, CD34, CD43 oder Glycophorin A nicht auf diesen Zellen exprimiert [Colter et al., 2000; Bruder et al., 1997; Simmons und Torok-Storb, 1991]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellen vor den Transduktionsversuchen zeigte vergleichbare Resultate. So konnten auf den Zellen die Oberflächenmarker CD29, CD44, CD71, CD90 und CD105 nachgewiesen werden, jedoch nicht die hämatopoetischen Marker CD45 und CD34. Interessanterweise zeigten die Zellen eine sehr schwache Expression des Antigens CD14, welches normalerweise auf myelomonozytischen Zellen zu finden ist. Solche geringen Abweichungen können aber aufgrund der heterogenen Natur der mesenchymalen Stammzellen nicht ausgeschlossen werden. Auch die Gentransferversuche erwiesen sich als erfolgreich. In allen drei Versuchen konnten mit einem einzigen Transduktionsschritt, der über Nacht erfolgte, Gentransferraten zwischen 84% und 99% erzielt werden. Derzeit gibt es noch nicht viel Literatur zu dieser Thematik, doch scheinen andere Arbeitsgruppen zu ähnlichen Ergebnissen zu kommen. So berichten van Damme et al. von Transduktionsraten von fast 100%, die sie mit Hilfe lentiviraler Vektoren erreichen konnten [van Damme et al., 2006]. Transduzierte mesenchymale Stammzellen behielten die hohe

Transgen-Expression nicht nur über einen längeren Zeitraum von mehreren Monaten bei, sondern auch nach Differenzierung in Knochen- oder Fettgewebe. Zudem konnten die Autoren auch ein effizientes Engraftment der transduzierten Zellen in NOD/SCID-Mausmodell nachweisen. Somit erweisen sich auch in diesem Zusammenhang lentivirale Vektoren als geeignete Werkzeuge für einen effizienten Gentransfer.

### 4.3 Untersuchungen im NOD/SCID-Mausmodell

Eine Voraussetzung für die Entwicklung von effizienten therapeutischen Ansätzen zur Behandlung von akuten Leukämien ist ein tieferes Verständnis der Biologie solcher Neoplasien. Dies geht jedoch nicht ohne Untersuchungen im Tiermodell, da eine Vielzahl komplexer biologischer Abläufe im Organismus in *In-vitro*-Versuchen nicht nachgestellt und eingehend analysiert werden können. So ist es beispielsweise nicht möglich, Prozesse, die das Entwicklungsprogramm normaler hämatopoetischer Stammzellen regulieren oder proliferative Erkrankungen wie Leukämien initiieren, *In-vitro* zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen erwies sich das NOD/SCID-Mausmodell hinsichtlich seiner Sensitivität und Konstanz beim Engraftment von humanen Zellen als besonders zuverlässig. Zudem zeigten Untersuchungen, dass akute Leukämien, die sich in NOD/SCID-Mäusen etablierten, hochgradig repräsentativ im Bezug auf die ursprüngliche Krankheit im Patienten waren, da deren Blasten eine identische Morphologie und ähnliches Verbreitungsmuster besaßen [Bonnet and Dick, 1997]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Transplantationsversuche im NOD/SCID-Mausmodell durchgeführt. Der erste Versuch, in dem das Engraftment von transduzierten Zellen untersucht werden sollte, umfasste lediglich zwei Tiere, denen Zellen mit einer initialen Gentransferrate von etwa 48% transplantiert wurden. Tatsächlich konnten in beiden Mäusen sowohl im Knochenmark, als auch in Milz und peripherem Blut humane AML-Zellen nachgewiesen werden. Deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl bewegte sich je nach Organ und Tier zwischen 1% und 8%. Innerhalb der Population der AML-Zellen lag der Anteil an transduzierten Zellen in einer Maus bei um die 35% und in der zweiten Maus bei um die 20%. Die transduzierten Zellen hatten also in den Mäusen erfolgreich repopuliert. Das Potential dieser Technik wird insbesondere durch die von John Dick und seinen

Mitarbeitern durchgeführten Markierungsstudien ersichtlich. Unter Verwendung eines lentiviralen Vektors, war es ihnen möglich im NOD/SCID-Modell einzelne transduzierte leukämische Stammzellen und deren Tochterzellen zu verfolgen. Dabei zeigten Analysen der viralen Integrationsstellen, dass die kleine Population der leukämischen Stammzellen sehr heterogen ist und verschiedene Klassen unterschieden werden können [Hope et al., 2004].

Der zweite Versuch, der hinsichtlich des Engraftments einen direkten Vergleich zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen liefern sollte, war dagegen nur wenig erfolgreich. Dieser umfasste acht Mäuse, von denen vier Tiere untransduzierte Zellen erhielten und den anderen vier Tieren transduzierte Zellen mit einer initialen Gentransferrate von etwa 64% transplantiert wurden. Sowohl nach sechs als auch nach acht Wochen wurden jeweils zwei Tiere, denen transduzierte Zellen appliziert worden waren, und zwei Tiere, die untransduzierte Zellen erhalten hatten, aus dem Versuch genommen. Dabei zeigte sich, dass von den vier Tieren, denen transduzierte Zellen transplantiert worden waren, einzig im Knochenmark der beiden Individuen, die nach sechs Wochen aus dem Versuch genommen worden waren, AML-Zellen nachgewiesen werden konnten. Doch auch hier wies der geringe prozentuale Anteil an Leukämiezellen im Knochenmark, der nur etwa 0,5% betrug, auf ein Problem bei der Repopulation der transduzierten Zellen hin. Von diesen 0,5% exprimierten wiederum etwa 40% *EGFP*. Das Gegenteil war bei den Mäusen der Fall, denen untransduzierte Zellen transplantiert worden waren. Hier konnten in Knochenmark, Milz und peripherem Blut aller vier Tiere humane leukämische Zellen nachgewiesen werden. Dabei war das Engraftment der Zellen in den Mäusen, die nach acht Wochen aus dem Versuch genommen wurden deutlich höher als in den Individuen, die nur sechs Wochen im Versuch verblieben waren. Warum in diesem Fall die transduzierten AML-Zellen nur sehr schlecht beziehungsweise gar nicht engraftet haben, bleibt unklar. Wie bereits diskutiert wurde, haben Untersuchungen gezeigt, dass die Transduktion mit retroviralen Überständen einen negativen Einfluss auf das sogenannte „Homing“ - also die Migration in das Knochenmark – und somit auch auf das Engraftment von humanen physiologischen CD34<sup>+</sup>-Zellen hat. Die Vermutung, dass eine Exposition von Leukämiezellen gegenüber viralen Partikeln einen ähnlichen Effekt hat, liegt daher nahe. Dabei sind die grundlegenden Mechanismen, die beim Engraftment von Leukämien im Mausmodell eine Rolle spielen, kaum verstanden. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass das Chemokin SDF-1

und sein Rezeptor CXCR4, von deren Interaktionen das Engraftment humaner physiologischer Stammzellen im NOD/SCID-Mausmodell abhängig ist, an diesen Prozessen beteiligt sind [Tavor et al., 2004], doch scheinen andere Signalwege in diesem Zusammenhang eine größere Rolle zu spielen.

Interessanterweise scheint es dabei einen Zusammenhang zwischen dem Engraftment von AML-Zellen im NOD/SCID-Modell und bestimmten, über den Karyotyp definierten prognostischen Gruppen zu geben [Monaco et al., 2004; Pearce et al., 2006]. Die Definition dieser, hinsichtlich des Ansprechens auf Therapien und des Krankheitsverlauf, prognostischen Gruppen basiert auf einer Studie des „UK Medical Research Council“ [Grimwade et al., 2001]. Dabei wurden Patienten unter 60 Jahren aufgrund ihrer Zytogenetik in Gruppen mit einer verhältnismäßig positiven Prognose oder mit einer ungünstigen Prognose oder aber mit einer intermediären Prognose eingeteilt. Bei den Patienten dieser letzten Gruppe, zu denen auch solche mit einem normalen Karyotyp zählen, ist der Krankheitsverlauf sehr unterschiedlich und nur schwer vorherzusagen. Auch die beiden AML-Erkrankungen, von denen Proben in den zwei Mausversuchen dieser Arbeit eingesetzt wurden, wiesen keine Chromosomen-Anomalien auf. Pearce et al. hatten in ihrer Studie gezeigt, dass AML-Erkrankungen aus dieser dritten Prognose-Gruppe, die in NOD/SCID-Mäusen engraften konnten, mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate der Patienten verbunden waren, als AML-Fälle, die nicht in der Lage waren, in den Tieren zu engraften [Pearce et al., 2006]. Laut den Autoren wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass das Engraftment im NOD/SCID-Modell die Natur der Stammzellen einer jeden individuellen AML reflektiert. AML-Proben, die in den Mäusen engraften, repräsentieren Erkrankungen, die von potenten Leukämie-initiierenden Zellen, die das hohe Selbsterneuerungs- und Proliferations-Potential von Stammzellen besitzen, aufrecht erhalten werden. Dagegen gehen Fälle von AML, die nicht engraften können, von weniger potenten Leukämie-initiierenden Zellen mit dem eingeschränkten Selbsterneuerungs- und Proliferations-Potential von Vorläuferzellen aus.

Letztendlich bleibt jedoch die Frage, in wie weit sich die im Mausmodell gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen, denn es gibt natürlich auch grundlegende Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies. So haben beispielsweise Mäuse im Vergleich zum Menschen einen signifikant höheren täglichen Umsatz von hämatopoetischen Zellen. Dem entsprechend wird das Innere

des Knochens, das nur von wenigen oder gar keinen Fettzellen durchsetzt ist, ausschließlich für die Hämatopoese genutzt. Maligne Vergrößerungen des hämatopoetischen Gewebes haben sehr schnell eine extramedulläre Hämatopoese, die gewöhnlich in der Milz beginnt, zur Folge. Bei fortgeschrittenen Krankheiten ist die normale Architektur der Milz vollständig aufgehoben und wird durch eine Vielzahl an Blasten ersetzt. Daher ist, im Gegensatz zur Leukämie beim Menschen, das Knochenmark nur in unterschiedlichem Maße, aber die Milz konstant an der murinen Leukämie beteiligt [Baum et al., 2003]. Kelly et al. vermuten aufgrund ihrer Studien mit murinen Lymphomen und Leukämien, dass bestimmte Krankheiten von einer relativ großen Population von Tumorzellen aufrecht erhalten werden können [Kelly et al., 2007]. Ihrer Meinung nach lassen die deutlichen Unterschiede zwischen ihren Resultaten und denen der AML-Versuche von Hope et al. [Hope et al., 2004] darauf schließen, dass in Xenotransplantations-Modellen der prozentuale Anteil an Tumorzellen, die die Neoplasie aufrecht erhalten, unterschätzt wird. Die Interpretation von Xenotransplantationsstudien wird durch die kritische Rolle, die Wechselwirkungen mit der Umgebung im Tumorwachstum, die von löslichen und membrangebundenen Faktoren vermittelt wird, erschwert. Viele murine Faktoren können nicht mit den verwandten human Rezeptoren interagieren und umgekehrt [Arai et al., 1990]. Daher reflektiert möglicherweise die geringe Frequenz an humanen AML-Zellen, die im NOD/SCID-Modell Tumorbildung initiieren können, teilweise die Minderheit humaner Tumorzellen, die sich an das Wachstum in einem fremden, murinen Milieu adaptiert haben. Quintana et al. konnten durch ihre Arbeiten belegen, dass auch modifizierte Konditionen in Xenotransplantations-Versuchen einen großen Einfluss auf die detektierbare Frequenz von tumorinitiierenden (tumorigenen) Zellen haben können [Quintana et al., 2008]. So zeigten sie, dass der nachweisbare Anteil an melanominitiierenden Zellen in stärker immunsupprimierten NOD/SCID-Mäusen (NOD/SCID  $\text{IL2rg}^{-/-}$ ), denen die gamma-Kette des Interleukin-2-Rezeptors fehlt, und die im Vergleich zu anderen NOD/SCID-Mäusen keine natürliche Killerzellaktivität besitzen, um mehrere Größenordnungen höher war, als in jenen NOD/SCID-Mäusen, die noch über eine natürliche Killerzellaktivität verfügen. Dies deutet darauf hin, dass einige Krebs-Erkrankungen, die im NOD/SCID-Mausmodell nur sehr wenige tumorigene Zellen besitzen, unter anderen Bedingungen plötzlich über sehr viel mehr Zellen mit tumorinitialem Potential verfügen. Trotz dieser Einschränkungen sind murine Tiermodelle, wie das NOD/SCID-Mausmodell,

notwendig, da sie nach wie vor einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Erkrankungen leisten.

#### 4.4 Ausblick

Der retrovirale Gentransfer gewinnt in der medizinischen Forschung zunehmend an Bedeutung, da diese Technik die Möglichkeit zur Behandlung verschiedener Krankheiten bietet und Einsicht in deren biologische Abläufe erlaubt. Ein aktuelles Beispiel dafür bieten die Arbeiten von Barabe et al. in einem murinen *In-vivo*-Modell für Leukämien, die aus primären, humanen, hämatopoetischen Zellen hervorgehen [Barabe et al., 2007]. Hier ermöglichte die retrovirale Transduktion dieser Zellen mit Fusionsgenen, die starke onkogene Eigenschaften besitzen und die spätere Analyse der retroviralen Insertionsstellen nicht nur erste Schritte zur Identifikation jener Zellpopulation, aus der eben die Zellen hervorgehen, die Leukämien initiieren und etablieren, sondern auch Einblicke in die Entwicklung dieser Zellen während der fortschreitenden Krankheit. Daneben werden retrovirale Insertionsmutagenesen eingesetzt, um etwas über die Funktion von Genen zu erfahren [Mikkers und Berns, 2003], und durch retrovirale Aktivierung von Onkogenen oder auch die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen lassen sich neue Gene identifizieren, welche in die Entstehung von Krebs involviert sind [Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2006].

Dabei finden neben den etablierten gammaretroviralen Vektorsystemen mittlerweile auch zunehmend lentivirale und foamyvirale Vektoren Verwendung. Durch die stetige Konstruktion neuerer und effizienterer Vektor-Generationen zeigen nun auch diese beiden Gentransfersysteme ihr Potential. So wurden foamyvirale Vektoren in einem Großtiermodell erfolgreich zur Behandlung einer Form der „Leukozyten Adhäsionsdefizienz“ eingesetzt [Bauer et al., 2008], während sie sich in anderen präklinischen Studien als besonders geeignet für die Verwendung bei anti-HIV-Gentherapien erwiesen haben [Taylor et al., 2008]. Die Resultate sind so vielversprechend, dass in naher Zukunft auch ein Einsatz dieser Vektortechnologie in humanen Studien zu erwarten ist. Gleiches gilt auch für die lentiviralen Vektorsysteme, die schon in Phase I-Studien verwendet worden sind [Levine et al., 2006]. Doch auch bei diesen beiden Gentransfersystemen stellt die Genotoxizität durch Insertionsmutagenesen ein potentiell Hindernis dar [Modlich et al., 2008].

Untersuchungen zeigten, dass foamyvirale Vektoren in nichtzufälliger Verteilung mit Präferenzen für CpG-Inseln und Transkriptionsstart-Bereiche integrieren, während lentivirale Integrationsstellen oft in aktiv exprimierten Genen zu finden sind. Zwar werden lentivirale und foamyvirale Vektorsysteme mit jeder neuen Generation sicherer, doch bietet dies noch keinen absoluten Schutz. Erst jetzt beginnt man langsam, die zugrunde liegenden Mechanismen, die bei der Integration in das Wirtsgenom eine Rolle spielen, und den daraus resultierenden Einfluss auf die Expression benachbarter Gene zu verstehen. Daher wird man auch weiterhin mit Komplikationen - die einen erwartet, die anderen überraschend - rechnen müssen. Man darf also gespannt sein, mit welchem Erfolg retrovirale Vektoren langfristig in Forschung und Medizin eingesetzt werden.

## 5 Zusammenfassung

Beim therapeutischen Gentransfer spielt der Einsatz gammaretroviraler Vektoren zur genetischen Modifikation von Zellen eine wichtige und zentrale Rolle. Doch inzwischen rücken mit Lenti- und Foamyviren zwei weitere retrovirale Vektorsysteme zunehmend in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesse, da sie über Eigenschaften verfügen, die sie zu potentiellen Alternativen bei gentherapeutischen Ansätzen machen. Daher sollte der vorliegenden Arbeit das Potential foamy- und lentiviraler Vektoren zur Transduktion von physiologischen und malignen, hämatopoetischen Stammzellen untersucht und mit dem von Gamma-Retroviren verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst für die lentiviralen und foamyviralen Vektorsysteme Transfektionsprotokolle für die Generierung hochtitriger Überstände entwickelt. Dies gelang jedoch nur für die lentiviralen Vektoren, deren Überstände Titer von bis zu  $4,8 \times 10^6$  IE/ml besaßen. Dagegen erreichten die foamyviralen Präparationen nur Titer von bis zu  $3,6 \times 10^4$  IE/ml. Die Gründe für die niedrigen foamyviralen Titer sind unklar. Für die gammaretroviralen Vektoren stand eine stabile Produzentenzelllinie zur Verfügung, deren Überstände Titer von um die  $1 \times 10^5$  IE/ml aufwiesen.

Neben den Titrationen dienten auch Transduktionsversuche in leukämischen Zelllinien der Evaluation des Gentransferpotentials der hergestellten Überstände. So konnten mit den foamyviralen Überständen nur Transduktionsraten von unter 10% erreicht werden, während mit den lentiviralen und gammaretroviralen Vektoren Gentransferraten von über 80% erzielt wurden. Weitere Versuche mit primären hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen bestätigten diese Resultate. So konnten im Rahmen dieser Versuchsreihe, bei der auch unterschiedliche Transduktionsprotokolle getestet wurden, mit lentiviralen Überständen durchschnittliche Gentransfereffizienzen von bis zu 28%, und mit den gammaretroviralen Vektoren sogar von bis zu 36% erreicht werden. Dagegen lag im Schnitt der Anteil an transduzierten Zellen bei der Verwendung des foamyviralen Vektorsystems immer unter 1%.

Die lentiviralen und gammaretroviralen Vektorsysteme wurden zudem für Gentransferversuche in primären leukämischen Zellen verwendet. Die hierbei



generierten Daten wiesen insgesamt eine große Streuung auf. So lagen die Transduktionsraten, die mit lentiviralen Überständen in den Zellen erzielt werden konnten, zwischen 0% und 75%, während der Anteil an transduzierten Zellen bei Einsatz des gammaretroviralen Vektorsystems zwischen 0% und 55% variierte.

Des Weiteren wurden zwei Transplantationsversuche im NOD/SCID-Mausmodell durchgeführt, um das Engraftment von untransduzierten und lentiviral transduzierten AML-Zellen *In-vivo* zu untersuchen. Tatsächlich konnten im ersten Versuch transduzierte humane AML-Zellen sowohl im Knochenmark, als auch in der Milz und im peripheren Blut der Tiere nachgewiesen werden. Der zweite Versuch, war dagegen nur wenig erfolgreich, da nur bei zwei von vier Tieren, denen transduzierte AML-Zellen appliziert worden waren, ein sehr geringer prozentualer Anteil an transduzierten Leukämiezellen lediglich im Knochenmark zu finden war. Das Gegenteil war bei den Mäusen der Fall, denen als Kontrolle untransduzierte Zellen transplantiert worden waren. Hier war in allen Tieren ein gutes Anwachsen der humanen leukämischen Zellen zu beobachten. So lag der Anteil an AML-Zellen im murinen Knochenmark einzelner Tiere bei über 65%.

Neben den Gentransferversuchen in physiologischen und leukämischen hämatopoetischen Stammzellen, wurden lentivirale Überstände auch zur Transduktion von mesenchymalen Stammzellen eingesetzt. Dabei wurden Gentransferraten von bis zu 99% erreicht. Insgesamt bewiesen in der vorgelegten Dissertation das gammaretrovirale und insbesondere aber das lentivirale Vektorsystem ein großes Potential bei der Transduktion von hämatopoetischen Zellen, was sie zu vielversprechenden Werkzeugen im Bereich der Forschung und der Gentherapie macht.

## 6 Literatur

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G. and Bordignon, C. (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." *Science*; **296** (5577): 2410-3.

Al Yacoub, N., Romanowska, M., Haritonova, N. and Foerster, J. (2007). "Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts." *J Gene Med*; **9** (7): 579-84.

Allay, J. A., Dennis, J. E., Haynesworth, S. E., Majumdar, M. K., Clapp, D. W., Shultz, L. D., Caplan, A. I. and Gerson, S. L. (1997). "LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors." *Hum Gene Ther*; **8** (12): 1417-27.

Andrews, R. G., Briddell, R. A., Knitter, G. H., Rowley, S. D., Appelbaum, F. R. and McNiece, I. K. (1995). "Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates." *Blood*; **85** (1): 15-20.

Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J. E., Rinder, H. M., Civin, C., Cheng, L. and Krause, D. S. (2003). "Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice." *Exp Hematol*; **31** (5): 413-20.

Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990). "Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses." *Annu Rev Biochem*; **59**: 783-836.

Baldwin, D. N. and Linial, M. L. (1998). "The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus." *J Virol*; **72** (5): 3658-65.

Ballen, K., Becker, P. S., Greiner, D., Valinski, H., Shearin, D., Berrios, V., Dooner, G., Hsieh, C. C., Wu, J., Shultz, L., Cerny, J., Leif, J., Stewart, F. M. and Quesenberry, P. (2000). "Effect of ex vivo cytokine treatment on human cord blood engraftment in NOD-scid mice." *Br J Haematol*; **108** (3): 629-40.

Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." *Nature*; **226** (5252): 1209-11.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., Van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S. (1994). "The CD40 antigen and its ligand." *Annu Rev Immunol*; **12**: 881-922.

Barabe, F., Kennedy, J. A., Hope, K. J. and Dick, J. E. (2007). "Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice." *Science*; **316** (5824): 600-4.

Barquinero, J., Segovia, J. C., Ramirez, M., Limon, A., Guenechea, G., Puig, T., Briones, J., Garcia, J. and Bueren, J. A. (2000). "Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice." *Blood*; **95** (10): 3085-93.

Bartz, S. R., Rogel, M. E. and Emerman, M. (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control." *J Virol*; **70** (4): 2324-31.

- Bauer, T. R., Jr., Allen, J. M., Hai, M., Tuschong, L. M., Khan, I. F., Olson, E. M., Adler, R. L., Burkholder, T. H., Gu, Y. C., Russell, D. W. and Hickstein, D. D. (2008). "Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors." *Nat Med*; **14** (1): 93-7.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A. and Von Kalle, C. (2003). "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells." *Blood*; **101** (6): 2099-114.
- Baum, C., Eckert, H. G., Stockschlader, M., Just, U., Hegewisch-Becker, S., Hildinger, M., Uhde, A., John, J. and Ostertag, W. (1996). "Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection." *J Hematother*; **5** (4): 323-9.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res*; **7** (6): 1513-23.
- Blesch, A. (2004). "Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer." *Methods*; **33** (2): 164-72.
- Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med*; **3** (7): 730-7.
- Bonneville, J.-M. and Hohn, T. (1993). "A reverse transcriptase for cauliflower mosaic virus - state of the art, 1992." In: Reverse Transcriptase. Skalka, A. M. and Goff, S. P. (Eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 357-390.
- Bradstock, K., Makrynika, V., Bianchi, A. and Byth, K. (1993). "Analysis of the mechanism of adhesion of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells to bone marrow fibroblasts." *Blood*; **82** (11): 3437-44.
- Briones, J., Puig, T., Limon, A., Petriz, J., Garcia, J. and Barquinero, J. (1999). "Retroviral gene transfer into human hematopoietic cells: an in vitro kinetic study." *Haematologica*; **84** (6): 483-8.
- Bruce, W. R. and Van Der Gaag, H. (1963). "A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo." *Nature*; **199**: 79-80.
- Bruder, S. P., Horowitz, M. C., Mosca, J. D. and Haynesworth, S. E. (1997). "Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens." *Bone*; **21** (3): 225-35.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., Ricalton, N. S., Mosca, J. D., Kraus, K. H. and Kadiyala, S. (1998). "Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration." *Clin Orthop Relat Res*; (355 Suppl): S247-56.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and Stevenson, M. (1993). "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." *Nature*; **365** (6447): 666-9.
- Bulabois, C. E., Yerly-Motta, V., Mortensen, B. T., Fixe, P., Remy-Martin, J. P., Herve, P., Tiberghien, P. and Charbord, P. (1998). "Retroviral-mediated marker gene transfer in hematopoiesis-supportive marrow stromal cells." *J Hematother*; **7** (3): 225-39.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J. K. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer

and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (17): 8033-7.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., De Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. and Fischer, A. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." *Science*; **288** (5466): 669-72.

Chang, L. J. and Zaiss, A. K. (2002). "Lentiviral vectors. Preparation and use." *Methods Mol Med*; **69**: 303-18.

Chien, M. L., Foster, J. L., Douglas, J. L. and Garcia, J. V. (1997). "The amphotropic murine leukemia virus receptor gene encodes a 71-kilodalton protein that is induced by phosphate depletion." *J Virol*; **71** (6): 4564-70.

Chuah, M. K., Van Damme, A., Zwinnen, H., Goovaerts, I., Vanslembrouck, V., Collen, D. and Vandendriessche, T. (2000). "Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice." *Hum Gene Ther*; **11** (5): 729-38.

Coffin, J. M. (1990). "Retroviridae and their replication." In: Fundamental Virology. Fields, B. N. and Knipe, D. M. (Eds.) New York, Raven Press: 645-708.

Coffin, J. M. (1992a). "Genetic diversity and evolution of retroviruses." *Curr Top Microbiol Immunol*; **176**: 143-64.

Coffin, J. M. (1992b). "Structure and classification of retroviruses." In: The Retroviridae. Levy, J. A. (Ed.). New York, Plenum Press: 19-49.

Coleman, J. E., Huentelman, M. J., Kasparov, S., Metcalfe, B. L., Paton, J. F., Katovich, M. J., Semple-Rowland, S. L. and Raizada, M. K. (2003). "Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo." *Physiol Genomics*; **12** (3): 221-8.

Colter, D. C., Class, R., Digirolamo, C. M. and Prockop, D. J. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97** (7): 3213-8.

Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. and Collins, M. K. (1995). "High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum." *J Virol*; **69** (12): 7430-6.

Cui, Y., Golob, J., Kelleher, E., Ye, Z., Pardoll, D. and Cheng, L. (2002). "Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells." *Blood*; **99** (2): 399-408.

Dao, M. A., Hashino, K., Kato, I. and Nolte, J. A. (1998). "Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood*; **92** (12): 4612-21.

Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R. and Yarmush, M. L. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J*; **86** (2): 1234-42.

- De Vos, J., Bagnis, C., Bonnafoux, L., Requirand, G., Jourdan, M., Imbert, M. C., Jourdan, E., Rossi, J. F., Mannoni, P. and Klein, B. (2003). "Comparison of murine leukemia virus, human immunodeficiency virus, and adeno-associated virus vectors for gene transfer in multiple myeloma: lentiviral vectors demonstrate a striking capacity to transduce low-proliferating primary tumor cells." *Hum Gene Ther*, **14** (18): 1727-39.
- Deans, R. J. and Moseley, A. B. (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." *Exp Hematol*, **28** (8): 875-84.
- Deininger, M., Buchdunger, E. and Druker, B. J. (2005). "The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia." *Blood*, **105** (7): 2640-53.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M. and Melo, J. V. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." *Blood*, **96** (10): 3343-56.
- Donahue, R. E., Sorrentino, B. P., Hawley, R. G., An, D. S., Chen, I. S. and Wersto, R. P. (2001). "Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells." *Mol Ther*, **3** (3): 359-67.
- Dorrell, C., Gan, O. I., Pereira, D. S., Hawley, R. G. and Dick, J. E. (2000). "Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function." *Blood*, **95** (1): 102-10.
- D'souza, V. and Summers, M. F. (2005). "How retroviruses select their genomes." *Nat Rev Microbiol*, **3** (8): 643-55.
- Dubridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. and Calos, M. P. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol Cell Biol*, **7** (1): 379-87.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol*, **72** (11): 8463-71.
- Dunbar, C. E., Seidel, N. E., Doren, S., Sellers, S., Cline, A. P., Metzger, M. E., Agricola, B. A., Donahue, R. E. and Bodine, D. M. (1996). "Improved retroviral gene transfer into murine and Rhesus peripheral blood or bone marrow repopulating cells primed in vivo with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (21): 11871-6.
- Ebeling, P., Bach, P., Sorg, U., Schneider, A., Trarbach, T., Dilloo, D., Hanenberg, H., Niesert, S., Seeber, S., Moritz, T. and Flasshove, M. (2007). "Evaluation of different protocols for gene transfer into non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency disease mouse repopulating cells." *J Cancer Res Clin Oncol*, **133** (3): 199-209.
- Eiden, M. V., Farrell, K. B. and Wilson, C. A. (1996). "Substitution of a single amino acid residue is sufficient to allow the human amphotropic murine leukemia virus receptor to also function as a gibbon ape leukemia virus receptor." *J Virol*, **70** (2): 1080-5.
- Ellis, J. (2005). "Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors." *Hum Gene Ther*, **16** (11): 1241-6.

- Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J. and Stamatoyannopoulos, G. (2000). "A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97** (16): 9150-5.
- Emi, N., Friedmann, T. and Yee, J. K. (1991). "Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus." *J Virol*; **65** (3): 1202-7.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U. and Rethwilm, A. (1997). "Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle." *J Virol*; **71** (10): 7312-7.
- Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A. and Naldini, L. (2001). "A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors." *Hum Gene Ther*; **12** (8): 981-97.
- Fassati, A. (2006). "HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem." *Retrovirology*; **3**: 74.
- Ferguson, C., Larochelle, A. and Dunbar, C. E. (2005). "Hematopoietic stem cell gene therapy: dead or alive?" *Trends Biotechnol*; **23** (12): 589-97.
- Finer, M. H., Dull, T. J., Qin, L., Farson, D. and Roberts, M. R. (1994). "kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes." *Blood*; **83** (1): 43-50.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J. G. and Rethwilm, A. (1998). "Foamy virus particle formation." *J Virol*; **72** (2): 1610-5.
- Fleming, W. H., Alpern, E. J., Uchida, N., Ikuta, K. and Weissman, I. L. (1993). "Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (8): 3760-4.
- Flugel, R. M., Rethwilm, A., Maurer, B. and Darai, G. (1987). "Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes." *Embo J*; **6** (7): 2077-84.
- Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M. and Naldini, L. (2000). "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences." *Nat Genet*; **25** (2): 217-22.
- Follenzi, A. and Naldini, L. (2002). "HIV-based vectors. Preparation and use." *Methods Mol Med*; **69**: 259-74.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. (1997). "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94** (18): 9825-30.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. and Trono, D. (1995). "HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase." *Cell*; **83** (4): 569-76.
- Ganem, D. and Schneider, R. (2001). "Hepadnaviridae: The viruses and their replication." In: Fields' Virology. Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 2923-2969.

- Gao, X., Kim, K. S. and Liu, D. (2007). "Nonviral gene delivery: what we know and what is next." *Aaps J*; **9** (1): E92-104.
- Geijtenbeek, T. B., Van Kooyk, Y., Van Vliet, S. J., Renes, M. H., Raymakers, R. A. and Figdor, C. G. (1999). "High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia." *Blood*; **94** (2): 754-64.
- Geraerts, M., Michiels, M., Baekelandt, V., Debyser, Z. and Gijssbers, R. (2005). "Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration." *J Gene Med*; **7** (10): 1299-310.
- Glaspy, J. A., Shpall, E. J., Lemaistre, C. F., Briddell, R. A., Menchaca, D. M., Turner, S. A., Lill, M., Chap, L., Jones, R., Wiers, M. D., Sheridan, W. P. and Mcniece, I. K. (1997). "Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients." *Blood*; **90** (8): 2939-51.
- Graham, F. L. and Van Der Eb, A. J. (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology*; **52** (2): 456-67.
- Greene, W. C. (1991). "The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med*; **324** (5): 308-17.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C. J., Wheatley, K., Burnett, A. K. and Goldstone, A. H. (2001). "The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial." *Blood*; **98** (5): 1312-20.
- Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S. and Simmons, P. J. (1994). "The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors." *Blood*; **84** (12): 4164-73.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. and Shi, S. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97** (25): 13625-30.
- Gronthos, S. and Simmons, P. J. (1996). "The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors." *J Hematother*; **5** (1): 15-23.
- Guenechea, G., Gan, O. I., Dorrell, C. and Dick, J. E. (2001). "Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential." *Nat Immunol*; **2** (1): 75-82.
- Guenechea, G., Gan, O. I., Inamitsu, T., Dorrell, C., Pereira, D. S., Kelly, M., Naldini, L. and Dick, J. E. (2000). "Transduction of human CD34+ CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors." *Mol Ther*; **1** (6): 566-73.
- Haas, D. L., Case, S. S., Crooks, G. M. and Kohn, D. B. (2000). "Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors." *Mol Ther*; **2** (1): 71-80.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., De Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2003). "LMO2-associated

clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science*; **302** (5644): 415-9.

Hall, K. M., Horvath, T. L., Abonour, R., Cornetta, K. and Srour, E. F. (2006). "Decreased homing of retrovirally transduced human bone marrow CD34+ cells in the NOD/SCID mouse model." *Exp Hematol*; **34** (4): 433-42.

Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I. and Williams, D. A. (1996). "Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells." *Nat Med*; **2** (8): 876-82.

Hao, Q. L., Shah, A. J., Thiemann, F. T., Smogorzewska, E. M. and Crooks, G. M. (1995). "A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow." *Blood*; **86** (10): 3745-53.

Hargrove, P. W., Vanin, E. F., Kurtzman, G. J. and Nienhuis, A. W. (1997). "High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3' gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells." *Blood*; **89** (6): 2167-75.

Haseltine, W. A. (1991). "Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1." *Faseb J*; **5** (10): 2349-60.

Hawley, R. G., Lieu, F. H., Fong, A. Z. and Hawley, T. S. (1994). "Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy." *Gene Ther*; **1** (2): 136-8.

Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D. and Rethwilm, A. (2002a). "Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs." *J Virol*; **76** (8): 3774-83.

Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H. and Rethwilm, A. (2002b). "Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids." *J Virol*; **76** (19): 10069-73.

Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenroder, O. and Rethwilm, A. (2000). "Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome." *Embo J*; **19** (13): 3436-45.

Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J. and Rethwilm, A. (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." *J Virol*; **72** (8): 6307-14.

Herchenroder, O., Moosmayer, D., Bock, M., Pietschmann, T., Rethwilm, A., Bieniasz, P. D., McClure, M. O., Weis, R. and Schneider, J. (1999). "Specific binding of recombinant foamy virus envelope protein to host cells correlates with susceptibility to infection." *Virology*; **255** (2): 228-36.

Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W. and Baum, C. (1999). "Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use." *J Virol*; **73** (5): 4083-9.

Hope, K. J., Jin, L. and Dick, J. E. (2004). "Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity." *Nat Immunol*; **5** (7): 738-43.



- Horn, P. A., Topp, M. S., Morris, J. C., Riddell, S. R. and Kiem, H. P. (2002). "Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells." *Blood*; **100** (12): 3960-7.
- Ikeda, Y., Takeuchi, Y., Martin, F., Cosset, F. L., Mitrophanous, K. and Collins, M. (2003). "Continuous high-titer HIV-1 vector production." *Nat Biotechnol*; **21** (5): 569-72.
- Jansen, M., Sorg, U. R., Ragg, S., Flasshove, M., Seeber, S., Williams, D. A. and Moritz, T. (2002). "Hematoprotection and enrichment of transduced cells in vivo after gene transfer of MGMT(P140K) into hematopoietic stem cells." *Cancer Gene Ther*; **9** (9): 737-46.
- Jarmy, G., Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C. and Rethwilm, A. (2001). "Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system." *J Med Virol*; **64** (3): 223-31.
- Josephson, N. C., Trobridge, G. and Russell, D. W. (2004). "Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors." *Hum Gene Ther*; **15** (1): 87-92.
- Josephson, N. C., Vassilopoulos, G., Trobridge, G. D., Priestley, G. V., Wood, B. L., Papayannopoulou, T. and Russell, D. W. (2002). "Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99** (12): 8295-300.
- Kafri, T., Van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F. H. and Verma, I. M. (1999). "A packaging cell line for lentivirus vectors." *J Virol*; **73** (1): 576-84.
- Kahn, J., Byk, T., Jansson-Sjostrand, L., Petit, I., Shivtiel, S., Nagler, A., Hardan, I., Deutsch, V., Gazit, Z., Gazit, D., Karlsson, S. and Lapidot, T. (2004). "Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation." *Blood*; **103** (8): 2942-9.
- Kelly, P. N., Dakic, A., Adams, J. M., Nutt, S. L. and Strasser, A. (2007). "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells." *Science*; **317** (5836): 337.
- Klages, N., Zufferey, R. and Trono, D. (2000). "A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors." *Mol Ther*; **2** (2): 170-6.
- Koldej, R., Cmielewski, P., Stocker, A., Parsons, D. W. and Anson, D. S. (2005). "Optimisation of a multipartite human immunodeficiency virus based vector system; control of virus infectivity and large-scale production." *J Gene Med*; **7** (11): 1390-9.
- Konvalinka, J., Litterst, M. A., Welker, R., Kottler, H., Rippmann, F., Heuser, A. M. and Krausslich, H. G. (1995). "An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity." *J Virol*; **69** (11): 7180-6.
- Korin, Y. D. and Zack, J. A. (1998). "Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells." *J Virol*; **72** (4): 3161-8.
- Koya, R. C., Kasahara, N., Pullarkat, V., Levine, A. M. and Stripecke, R. (2002). "Transduction of acute myeloid leukemia cells with third generation self-inactivating lentiviral vectors expressing CD80 and GM-CSF: effects on proliferation, differentiation, and stimulation of allogeneic and autologous anti-leukemia immune responses." *Leukemia*; **16** (9): 1645-54.

- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I. and May, W. S. (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." *Blood*; **87** (1): 1-13.
- Kumar, M., Bradow, B. P. and Zimmerberg, J. (2003). "Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64." *Hum Gene Ther*; **14** (1): 67-77.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A. and Dick, J. E. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature*; **367** (6464): 645-8.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A. and Dick, J. E. (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." *Nat Med*; **2** (12): 1329-37.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K. E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D. A. and Hanenberg, H. (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." *Hum Gene Ther*; **14** (6): 509-19.
- Levine, B. L., Humeau, L. M., Boyer, J., Macgregor, R. R., Rebello, T., Lu, X., Binder, G. K., Slepishkin, V., Lemiale, F., Mascola, J. R., Bushman, F. D., Dropulic, B. and June, C. H. (2006). "Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **103** (46): 17372-7.
- Levy, J. P., Muldoon, R. R., Zolotukhin, S. and Link, C. J., Jr. (1996). "Retroviral transfer and expression of a humanized, red-shifted green fluorescent protein gene into human tumor cells." *Nat Biotechnol*; **14** (5): 610-4.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. and Pardee, A. B. (1995). "Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein." *Science*; **268** (5209): 429-31.
- Lindemann, D. and Goepfert, P. A. (2003). "The foamy virus envelope glycoproteins." *Curr Top Microbiol Immunol*; **277**: 111-29.
- Lindemann, D. and Rethwilm, A. (1998). "Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing." *J Virol*; **72** (5): 4088-94.
- Linial, M. L. (1999). "Foamy viruses are unconventional retroviruses." *J Virol*; **73** (3): 1747-55.
- Lochelt, M., Muranyi, W. and Flugel, R. M. (1993). "Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (15): 7317-21.
- Loeb, D. D. and Ganem, D. (1993). "Reverse transcription pathway of the hepatitis B virus." In: Reverse transcriptase. Skalka, A. M. and Goff, S. P. (Eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 329-355.
- Logan, A. C., Lutzko, C. and Kohn, D. B. (2002). "Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells." *Curr Opin Biotechnol*; **13** (5): 429-36.
- Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M. J., Dennis, J., Haynesworth, S. E. and Koc, O. N. (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." *Bone Marrow Transplant*; **33** (6): 597-604.

- Makrynika, V. and Bradstock, K. F. (1993). "Adhesion of precursor-B acute lymphoblastic leukaemia cells to bone marrow stromal proteins." *Leukemia*; **7** (1): 86-92.
- Manabe, A., Coustan-Smith, E., Behm, F. G., Raimondi, S. C. and Campana, D. (1992). "Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia." *Blood*; **79** (9): 2370-7.
- Mascarenhas, L., Stripecke, R., Case, S. S., Xu, D., Weinberg, K. I. and Kohn, D. B. (1998). "Gene delivery to human B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells." *Blood*; **92** (10): 3537-45.
- Mazurier, F., Gan, O. I., McKenzie, J. L., Doedens, M. and Dick, J. E. (2004). "Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment." *Blood*; **103** (2): 545-52.
- Mergia, A., Chari, S., Kolson, D. L., Goodenow, M. M. and Ciccarone, T. (2001). "The efficiency of simian foamy virus vector type-1 (SFV-1) in nondividing cells and in human PBLs." *Virology*; **280** (2): 243-52.
- Mergia, A. and Heinkelein, M. (2003). "Foamy virus vectors." *Curr Top Microbiol Immunol*; **277**: 131-59.
- Mikkers, H. and Berns, A. (2003). "Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways." *Adv Cancer Res*; **88**: 53-99.
- Miller, A. D. (1990). "Retrovirus packaging cells." *Hum Gene Ther*; **1** (1): 5-14.
- Mitta, B., Rimann, M. and Fussenegger, M. (2005). "Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high-performance HIV-1-derived lentiviral particles." *Metab Eng*; **7** (5-6): 426-36.
- Miyazaki, Y., Takamatsu, T., Nosaka, T., Fujita, S., Martin, T. E. and Hatanaka, M. (1995). "The cytotoxicity of human immunodeficiency virus type 1 Rev: implications for its interaction with the nucleolar protein B23." *Exp Cell Res*; **219** (1): 93-101.
- Modlich, U., Böhne, J., Schmidt, M., Von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A. and Baum, C. (2006). "Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity." *Blood*; **108** (8): 2545-53.
- Modlich, U., Schambach, A., Brugman, M. H., Wicke, D. C., Knoess, S., Li, Z., Maetzig, T., Rudolph, C., Schlegelberger, B. and Baum, C. (2008). "Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16." *Leukemia*; **22** (8): 1519-28.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O. and Rethwilm, A. (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." *J Virol*; **71** (10): 7305-11.
- Monaco, G., Konopleva, M., Munsell, M., Leysath, C., Wang, R. Y., Jackson, C. E., Korbling, M., Estey, E., Belmont, J. and Andreeff, M. (2004). "Engraftment of acute myeloid leukemia in NOD/SCID mice is independent of CXCR4 and predicts poor patient survival." *Stem Cells*; **22** (2): 188-201.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., Von Kalle, C. and Naldini, L. (2006). "Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration." *Nat Biotechnol*; **24** (6): 687-96.

- Moritz, T., Dutt, P., Xiao, X., Carstanjen, D., Vik, T., Hanenberg, H. and Williams, D. A. (1996). "Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments." *Blood*; **88** (3): 855-62.
- Mostoslavsky, G., Kotton, D. N., Fabian, A. J., Gray, J. T., Lee, J. S. and Mulligan, R. C. (2005). "Efficiency of transduction of highly purified murine hematopoietic stem cells by lentiviral and oncoretroviral vectors under conditions of minimal in vitro manipulation." *Mol Ther*; **11** (6): 932-40.
- Murray, L., Luens, K., Tushinski, R., Jin, L., Burton, M., Chen, J., Forestell, S. and Hill, B. (1999). "Optimization of retroviral gene transduction of mobilized primitive hematopoietic progenitors by using thrombopoietin, Flt3, and Kit ligands and RetroNectin culture." *Hum Gene Ther*; **10** (11): 1743-52.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. and Verma, I. M. (1996a). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (21): 11382-8.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. (1996b). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science*; **272** (5259): 263-7.
- Naviaux, R. K., Costanzi, E., Haas, M. and Verma, I. M. (1996). "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses." *J Virol*; **70** (8): 5701-5.
- Nesbeth, D., Williams, S. L., Chan, L., Brain, T., Slater, N. K., Farzaneh, F. and Darling, D. (2006). "Metabolic biotinylation of lentiviral pseudotypes for scalable paramagnetic microparticle-dependent manipulation." *Mol Ther*; **13** (4): 814-22.
- Ni, Y., Sun, S., Oparaocha, I., Humeau, L., Davis, B., Cohen, R., Binder, G., Chang, Y. N., Slepishkin, V. and Dropulic, B. (2005). "Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector." *J Gene Med*; **7** (6): 818-34.
- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. and Sorrentino, B. P. (2006). "Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells." *Mol Ther*; **13** (6): 1031-49.
- O'hara, B., Johann, S. V., Klinger, H. P., Blair, D. G., Robinson, H., Dunn, K. J., Sass, P., Vitek, S. M. and Robins, T. (1990). "Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus." *Cell Growth Differ*; **1** (3): 119-27.
- Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W. B., Eiden, M. V. and Wilson, C. A. (1994). "The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter." *J Biol Chem*; **269** (41): 25426-31.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A. and Mulligan, R. C. (1996). "A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93** (21): 11400-6.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Luthi, U., Hassan, M., Thrasher, A. J., Hoelzer, D., Von Kalle, C., Seger, R. and Grez, M. (2006). "Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1." *Nat Med*; **12** (4): 401-9.

- Pacchia, A. L., Adelson, M. E., Kaul, M., Ron, Y. and Dougherty, J. P. (2001). "An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins." *Virology*, **282** (1): 77-86.
- Pages, J. C. and Bru, T. (2004). "Toolbox for retrovectorologists." *J Gene Med*; **6 Suppl 1**: S67-82.
- Parisi, E., Draznin, J., Stoopler, E., Schuster, S. J., Porter, D. and Sollecito, T. P. (2002). "Acute myelogenous leukemia: advances and limitations of treatment." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; **93** (3): 257-63.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. and Baltimore, D. (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90** (18): 8392-6.
- Pearce, D. J., Taussig, D., Zibara, K., Smith, L. L., Ridler, C. M., Preudhomme, C., Young, B. D., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A. and Bonnet, D. (2006). "AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML." *Blood*; **107** (3): 1166-73.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., Lider, O., Alon, R., Zipori, D. and Lapidot, T. (1999). "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." *Science*; **283** (5403): 845-8.
- Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M. and Rethwilm, A. (2005). "RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles." *J Virol*; **79** (11): 7005-13.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. and Lindemann, D. (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." *J Virol*; **73** (4): 2613-21.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science*; **284** (5411): 143-7.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M. and Morrison, S. J. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature*; **456** (7222): 593-8.
- Ramezani, A., Hawley, T. S. and Hawley, R. G. (2000). "Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells." *Mol Ther*; **2** (5): 458-69.
- Reiser, J. (2000). "Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors." *Gene Ther*; **7** (11): 910-3.
- Reiser, J., Zhang, X. Y., Hemenway, C. S., Mondal, D., Pradhan, L. and La Russa, V. F. (2005). "Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases." *Expert Opin Biol Ther*; **5** (12): 1571-84.
- Rethwilm, A. (2003). "The replication strategy of foamy viruses." *Curr Top Microbiol Immunol*; **277**: 1-26.
- Rice, A. M., Wood, J. A., Milross, C. G., Collins, C. J., Case, J., Vowels, M. R. and Nordon, R. E. (2001). "Prolonged ex vivo culture of cord blood CD34(+) cells facilitates myeloid and

megakaryocytic engraftment in the non-obese diabetic severe combined immunodeficient mouse model." *Br J Haematol*; **114** (2): 433-43.

Russell, D. W. and Miller, A. D. (1996). "Foamy virus vectors." *J Virol*; **70** (1): 217-22.

Ryan, D. H. (1993). "Adherence of normal and neoplastic human B cell precursors to the bone marrow microenvironment." *Blood Cells*; **19** (2): 225-41; discussion 241-4.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D. and Cosset, F. L. (2002). "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates." *Blood*; **100** (3): 823-32.

Santoni De Sio, F. R., Cascio, P., Zingale, A., Gasparini, M. and Naldini, L. (2006). "Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction." *Blood*; **107** (11): 4257-65.

Schambach, A., Bohne, J., Baum, C., Hermann, F. G., Egerer, L., Von Laer, D. and Giroglou, T. (2006a). "Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression." *Gene Ther*; **13** (7): 641-5.

Schambach, A., Bohne, J., Chandra, S., Will, E., Margison, G. P., Williams, D. A. and Baum, C. (2006b). "Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells." *Mol Ther*; **13** (2): 391-400.

Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Krausslich, H. G. and Baum, C. (2000). "Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors." *Mol Ther*; **2** (5): 435-45.

Scherr, M., Battmer, K., Blomer, U., Schiedlmeier, B., Ganzer, A., Grez, M. and Eder, M. (2002). "Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID-repopulating cells." *Blood*; **99** (2): 709-12.

Segura, M. M., Garnier, A., Durocher, Y., Coelho, H. and Kamen, A. (2007). "Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification." *Biotechnol Bioeng*; **98** (4): 789-99.

Sellers, S. E., Tisdale, J. F., Agricola, B. A., Donahue, R. E. and Dunbar, C. E. (2004). "The presence of the carboxy-terminal fragment of fibronectin allows maintenance of non-human primate long-term hematopoietic repopulating cells during extended ex vivo culture and transduction." *Exp Hematol*; **32** (2): 163-70.

Simmons, P. J., Gronthos, S., Zannettino, A., Ohta, S. and Graves, S. (1994). "Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis." *Prog Clin Biol Res*; **389**: 271-80.

Simmons, P. J. and Torok-Storb, B. (1991). "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow." *Blood*; **78** (11): 2848-53.

Sinn, P. L., Sauter, S. L. and Mccray, P. B., Jr. (2005). "Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production." *Gene Ther*; **12** (14): 1089-98.

Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J. (1995). "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors." *Nucleic Acids Res*; **23** (4): 628-33.

Srivastava, A. (2005). "Hematopoietic stem cell transduction by recombinant adeno-associated virus vectors: problems and solutions." *Hum Gene Ther*; **16** (7): 792-8.

Stewart, K., Walsh, S., Screen, J., Jefferiss, C. M., Chainey, J., Jordan, G. R. and Beresford, J. N. (1999). "Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells." *J Bone Miner Res*; **14** (8): 1345-56.

Stripecke, R., Cardoso, A. A., Pepper, K. A., Skelton, D. C., Yu, X. J., Mascarenhas, L., Weinberg, K. I., Nadler, L. M. and Kohn, D. B. (2000). "Lentiviral vectors for efficient delivery of CD80 and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in human acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia cells to induce antileukemic immune responses." *Blood*; **96** (4): 1317-26.

Sutherland, H. J., Lansdorp, P. M., Henkelman, D. H., Eaves, A. C. and Eaves, C. J. (1990). "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87** (9): 3584-8.

Suzuki, T., Minehata, K., Akagi, K., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (2006). "Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Blm-deficient mice." *Embo J*; **25** (14): 3422-31.

Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (2002). "New genes involved in cancer identified by retroviral tagging." *Nat Genet*; **32** (1): 166-74.

Tavor, S., Petit, I., Porozov, S., Avigdor, A., Dar, A., Leider-Trejo, L., Shemtov, N., Deutsch, V., Naparstek, E., Nagler, A. and Lapidot, T. (2004). "CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice." *Cancer Res*; **64** (8): 2817-24.

Taylor, J. A., Vojtech, L., Bahner, I., Kohn, D. B., Laer, D. V., Russell, D. W. and Richard, R. E. (2008). "Foamy virus vectors expressing anti-HIV transgenes efficiently block HIV-1 replication." *Mol Ther*; **16** (1): 46-51.

Temin, H. M. and Mizutani, S. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." *Nature*; **226** (5252): 1211-3.

Till, J. E. and Mc, C. E. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res*; **14**: 213-22.

Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J. and Russell, D. W. (2002a). "Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences." *Mol Ther*; **6** (3): 321-8.

Trobridge, G. and Russell, D. W. (2004). "Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors." *J Virol*; **78** (5): 2327-35.

Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N. and Russell, D. W. (2002b). "Gene transfer with foamy virus vectors." *Methods Enzymol*; **346**: 628-48.

Trobridge, G. D. and Russell, D. W. (1998). "Helper-free foamy virus vectors." *Hum Gene Ther*; **9** (17): 2517-25.

- Van Damme, A., Thorrez, L., Ma, L., Vandeburgh, H., Eyckmans, J., Dell'accio, F., De Bari, C., Luyten, F., Lillicrap, D., Collen, D., Vandendriessche, T. and Chuah, M. K. (2006). "Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells." *Stem Cells*; **24** (4): 896-907.
- Van Der Loo, J. C., Hanenberg, H., Cooper, R. J., Luo, F. Y., Lazaridis, E. N. and Williams, D. A. (1998). "Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse as a model system to study the engraftment and mobilization of human peripheral blood stem cells." *Blood*; **92** (7): 2556-70.
- Van Tendeloo, V. F., Van Broeckhoven, C. and Berneman, Z. N. (2001). "Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells." *Leukemia*; **15** (4): 523-44.
- Van Zeijl, M., Johann, S. V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T. B. and O'hara, B. (1994). "A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91** (3): 1168-72.
- Vassilopoulos, G., Trobridge, G., Josephson, N. C. and Russell, D. W. (2001). "Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors." *Blood*; **98** (3): 604-9.
- Verma, I. M. and Weitzman, M. D. (2005). "Gene therapy: twenty-first century medicine." *Annu Rev Biochem*; **74**: 711-38.
- Vogt, V. M. (1996). "Proteolytic processing and particle maturation." *Curr Top Microbiol Immunol*; **214**: 95-131.
- Vogt, V. M. (1997). "Retroviral virions and genomes." In: Retroviruses. Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, E. V. (Eds.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 27 - 70.
- Von Laer, D., Lindemann, D., Roscher, S., Herwig, U., Friel, J. and Herchenroder, O. (2001). "Low-level expression of functional foamy virus receptor on hematopoietic progenitor cells." *Virology*; **288** (1): 139-44.
- Vormoor, J., Lapidot, T., Pflumio, F., Risdon, G., Patterson, B., Broxmeyer, H. E. and Dick, J. E. (1994). "Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice." *Blood*; **83** (9): 2489-97.
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. and Kabat, D. (1991). "Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter." *Nature*; **352** (6337): 729-31.
- Williams, D. A., Nienhuis, A. W., Hawley, R. G. and Smith, F. O. (2000). "Gene Therapy 2000." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 376-393.
- Wognum, A. W., Visser, T. P., Peters, K., Bierhuizen, M. F. and Wagemaker, G. (2000). "Stimulation of mouse bone marrow cells with kit ligand, FLT3 ligand, and thrombopoietin leads to efficient retrovirus-mediated gene transfer to stem cells, whereas interleukin 3 and interleukin 11 reduce transduction of short- and long-term repopulating cells." *Hum Gene Ther*; **11** (15): 2129-41.
- Wu, M. and Mergia, A. (1999). "Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors." *J Virol*; **73** (5): 4498-501.
- Xu, K., Ma, H., Mccown, T. J., Verma, I. M. and Kafri, T. (2001). "Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors." *Mol Ther*; **3** (1): 97-104.



- Yang, P., Zamba, M., Aboud, M., Flugel, R. M. and Lochelt, M. (1997). "Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus." *Virus Genes*; **15** (1): 17-23.
- Yang, Y., Vanin, E. F., Whitt, M. A., Fornerod, M., Zwart, R., Schneiderman, R. D., Grosveld, G. and Nienhuis, A. W. (1995). "Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein." *Hum Gene Ther*; **6** (9): 1203-13.
- Yee, J. K., Friedmann, T. and Burns, J. C. (1994). "Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range." *Methods Cell Biol*; **43 Pt A**: 99-112.
- Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., Aoyama, K., Ishikawa, J., Sugahara, H., Matsumura, I., Tsai, S., Tomiyama, Y., Kanakura, Y. and Matsuzawa, Y. (1998). "Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains." *Blood*; **91** (9): 3263-72.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S. and Linial, M. L. (1996). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." *Science*; **271** (5255): 1579-82.
- Yu, S. F. and Linial, M. L. (1993). "Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay." *J Virol*; **67** (11): 6618-24.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D. and Linial, M. L. (1999). "Evidence that the human foamy virus genome is DNA." *J Virol*; **73** (2): 1565-72.
- Yu, S. F., Von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F. and Gilboa, E. (1986). "Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*; **83** (10): 3194-8.
- Ziegler, B. L., Thoma, S. J., Lamping, C. P., Valtieri, M., Muller, R., Samoggia, P., Buhring, H. J., Peschle, C. and Flidner, T. M. (1996). "Surface antigen expression on CD34+ cord blood cells: comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution (LD) RT-PCR of chymopapain-treated or untreated cells." *Cytometry*; **25** (1): 46-57.
- Zielske, S. P. and Braun, S. E. (2004). "Cytokines: value-added products in hematopoietic stem cell gene therapy." *Mol Ther*; **10** (2): 211-9.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. T. Moritz für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für die Betreuung bei der Durchführung im „Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie“ der Inneren Klinik (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Opalka für seine Unterstützung, die zahlreichen damit verbundenen Anregungen und Ratschläge, sowie seine Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu bewerten.

Frau Dr. U. R. Sorg und Herrn Dr. P. Ebeling möchte ich dafür danken, dass sie mir bei den tierexperimentellen Arbeiten immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn W. Stellberg für seine Unterstützung und die vielen wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen verpflichtet.

Für die wunderbare Atmosphäre sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Labors, ihre vielen hilfreichen Ideen und ihre tatkräftige Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Michael, Veronika, Ina, Anja und Ursula bedanken.

Mein besonderer Dank geht an meine ganze Familie, meine Freunde, sowie Bärbel und ihre Eltern für ihre große Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld während der letzten Jahre.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name	Ludwig
Vorname	Carsten
Geburtsdatum/-ort	28.03.1975, Düsseldorf
Familienstand	ledig

## Curriculum Vitae

---

1981 - 1985	Städt. Kath. Grundschule in Düsseldorf
1985 - 1994	Marie-Curie-Gymnasium in Düsseldorf Abschluss: Abitur
08.1994 – 10.1995	Zivildienst Diakonie – Evangelischer Gemeindedienst in Düsseldorf
10.1995	Aufnahme des Diplomstudienganges Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
02.1999	Vordiplom (Prüfungsfächer: allgemeine Biologie, Zoologie, Chemie und Physik)
11.2001 – 10.2002	Anfertigung der Diplomarbeit am Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 1 Titel der Arbeit: „Charakterisierung des Substrat-spektrums der ATP- abhängigen Protease Clp aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> “
10.2002 – 01.2003	Wissenschaftliche Tätigkeit am Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 1
10.2002	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe
seit 06.2003	Doktorand am Universitätsklinikum Essen, Innere Klinik - Tumorforschung, Labor von Prof. Dr. T. Moritz

Juli, 2009

Carsten Ludwig

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Gentransfer mittels unterschiedlicher viraler Gentransfervektoren in normale und maligne hämatopoetische Stammzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Carsten Ludwig befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers / Mitglieds  
der Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r Doktoranden/in

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden